
COMITÉ SCIENTIFIQUE

AVIS

en réponse à la saisine HCB - dossier NL-2011-96¹.

Paris, le 13 janvier 2016

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 15 juillet 2015 par les autorités compétentes françaises (le ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt) d'une demande d'avis relatif au dossier **EFSA-GMO-NL-2011-96** de demande d'autorisation de mise sur le marché du coton génétiquement modifié **GHB119** à des fins d'importation, transformation et alimentation humaine et animale.

Ce dossier a été déposé par la société **Bayer CropScience AG**, auprès des autorités compétentes néerlandaises sur le fondement du règlement (CE) n° 1829/2003.

L'objectif de cet avis est d'éclairer les autorités compétentes françaises en perspective d'un vote des Etats membres sur un projet de décision d'autorisation de mise sur le marché de ce coton pour les usages spécifiés dans l'Union européenne.

Le Comité scientifique (CS)² du HCB a examiné le dossier en séance du 16 décembre 2015 sous la présidence de Jean-Christophe Pagès. Le présent avis a été adopté par voie électronique le 13/01/16 et publié le 16 février 2016.

¹ La saisine HCB - dossier NL-2011-96 est reproduite dans l'Annexe 1.

² Les modalités de l'élaboration de l'avis et la composition du CS sont indiquées dans l'Annexe 2.

RESUME DE L'AVIS³

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi sur le fondement du règlement (CE) n°1829/2003 d'une demande d'avis relative au dossier EFSA-GMO-NL-2011-96. Déposé par la société Bayer CropScience AG auprès des autorités compétentes néerlandaises, ce dossier est une demande d'autorisation de mise sur le marché du coton génétiquement modifié GHB119 à des fins d'importation, transformation et alimentation humaine et animale.

L'objectif de cet avis est d'éclairer les autorités compétentes françaises en perspective d'un vote des Etats membres sur un projet de décision, proposé par la Commission européenne, relatif à l'autorisation de mise sur le marché de ce coton dans l'Union européenne pour les usages spécifiés.

Description du produit

Le Cotonnier GHB119 exprime le gène *cry2Ae* isolé de la bactérie *Bacillus thuringiensis* subsp. *dakota* (*B.t. dakota*) codant la protéine insecticide Cry2Ae ainsi que le gène *bar* isolé de *Streptomyces hygroscopicus* codant la Phosphinothricin-Acetyl-Transferase (PAT) conférant une résistance aux herbicides de type glufosinate d'ammonium. L'événement de transformation GHB119 a été obtenu par transformation de cals embryogénétiques par *Agrobacterium tumefaciens*. La sélection des régénérants génétiquement modifiés a été réalisée par sélection sur le caractère de résistance à l'herbicide.

L'événement présent dans le cotonnier GHB119 correspond à une insertion unique du T-DNA.

Il n'y a pas de preuve qu'un gène endogène du cotonnier ait été interrompu par l'événement de transformation générateur du cotonnier GHB119.

Une délétion de 8 pb⁴ s'est produite au site d'insertion du T-DNA.

Les analyses effectuées sont en accord avec une hérédité mendélienne d'un locus unique.

A l'exception du nectar, tous les tissus, à tous les stades de croissance testés, expriment les protéines CryA2e et PAT à des niveaux variables selon le tissu. Il n'est pas observé de différence significative liée au traitement herbicide. Le pétitionnaire ne mentionne pas d'effet lié au site mais les teneurs observées au niveau des graines sont en moyenne deux fois plus importantes en Espagne qu'aux Etats-Unis sans que cela ne soit expliqué dans le dossier.

Le nombre et le choix des sites d'essais sont corrects. Le dispositif expérimental (taille des parcelles, nombre d'années d'étude, nombre de sites) est correct. Les différences significatives qui sont observées entre la variété OGM et la variété contrôle sont d'un ordre de grandeur faible et sont comprises dans la variabilité observée pour les variétés commerciales de coton (attribuées à un effet site). La conclusion du pétitionnaire quant à l'absence de différence agronomique entre la variété PGM GHB119 et la variété non-transgénique utilisée comme contrôle est valide.

Les études ayant été, pour partie, réalisées avant les recommandations de l'EFSA sur la méthodologie statistique (EFSA, 2009), elles ne prennent pas en compte les nouvelles dispositions dans ce domaine. Toutefois, en l'absence de test d'équivalence, le pétitionnaire ne pouvait conclure, comme il l'a fait, dans ce sens.

³ Ce résumé ne se substitue pas à l'analyse du dossier développée dans cet avis.

⁴ pb : paires de base d'ADN

Impact sur la santé humaine et animale

En l'absence, notamment, d'une étude nutritionnelle jugée recevable, l'Anses n'a pu conclure quant à la sécurité sanitaire liée à la consommation des cotonniers portant l'événement GHB119 et de leurs produits dérivés.

Le CS du HCB prend acte des résultats de cette évaluation.

Risques de dispersion et impact sur l'environnement

Dans le cas où des graines viables de variétés améliorées viendraient à être dispersées, il est peu probable que dans des conditions naturelles et sans intervention humaine une population férale puisse s'installer de manière pérenne en France métropolitaine.

Il est cependant envisageable que des populations de cotonniers OGM puissent s'installer dans les RUP⁵ et les DROM-COM⁶. Ceci n'est pas considéré dans la demande. Le plan de surveillance devrait donc être revu pour tenir compte de cette possibilité.

Le CS du HCB note par ailleurs que si la germination, la floraison et le maintien d'une population férale de cotonnier est très peu probable en France métropolitaine, cela reste possible dans d'autres pays de l'Union Européenne par ailleurs producteur de coton comme l'Espagne, la Grèce ou la Bulgarie. Le développement de repousses et l'établissement de telles populations férales pourraient avoir un impact négatif sur les capacités de coexistence lors de l'importation dans des pays de l'UE cultivateurs de coton.

Dans la mesure où la demande ne concerne pas la mise en culture de cotonnier GHB119, la contamination pollinique ne peut être envisagée qu'après implantation de populations de cotonnier GHB119 liée à des graines viables directement importées ou qui, auraient, dans un premier temps, échappé aux processus de transformation post-récolte et qui, dans un second temps, auraient été disséminées accidentellement après importation. Si cet enchaînement venait à se produire en France métropolitaine, même dans le sud du territoire et dans la période climatique propice à la culture du cotonnier, il est très peu probable que des populations de cotonniers puissent s'implanter naturellement. La contamination pollinique ne peut avoir lieu que si des graines viables, échappées accidentellement, venaient à germer et produire des plantes susceptibles de parvenir à maturité.

Il existe en zone tropicale des conditions environnementales qui permettraient la persistance de cotonniers en cas d'échappement accidentel de graines viables. A partir de ces cotonniers il existe une possibilité d'observer des flux de gènes vers des cotonniers subspontanés, féraux ou sauvages présents à l'état pérenne dans ces régions. C'est le cas aux Antilles, en Polynésie et potentiellement en Guyane. Même, par exemple, en Guadeloupe où des cotonniers poussent à l'état naturel hors zones de culture et dans des conditions environnementales extrêmes (en particulier pédologiques) incompatibles avec la présence de variétés améliorées, ce risque faible ne peut être totalement exclu.

Plans de surveillance post-commercialisation

Le CS du HCB considère que les conclusions de l'évaluation des risques environnementaux proposée par le pétitionnaire sont justifiées par l'absence de demande de culture du coton GHB119 et l'absence de culture de coton (GM ou non GM) en France métropolitaine. Le CS du HCB s'accorde donc avec le

⁵ RUP : régions ultra périphériques de l'Union Européenne

⁶ Départements et Régions d'Outre-Mer - Collectivités d'Outre-Mer

pétitionnaire sur le fait qu'il n'y a pas lieu de mettre en place un plan de surveillance spécifique, mais de mettre en œuvre une surveillance générale pour l'importation, la transformation pour des usages de l'alimentation animale ou humaine ou non alimentaires, à l'exclusion d'une mise en culture.

Le CS du HCB demande que le suivi post-commercialisation soit prolongé au-delà de la durée de l'autorisation pour permettre l'écoulement du stock de graines en circulation dans la filière afin d'éviter d'éventuelles repousses, dans les DROM-COM en particulier.

Le plan de surveillance générale du pétitionnaire, qui indique l'organisation du suivi de la surveillance et de la démarche méthodologique qui sera observée, est satisfaisant.

Coexistence des filières

Les éléments nécessaires à la traçabilité ne sont pas disponibles car la quantification peut être faussée par la présence d'autres organismes en raison de l'absence de spécificité démontrée du gène de référence utilisé (adhC). Le pétitionnaire devrait fournir une autre méthode de quantification relative de coton GM spécifique de *G. hirsutum*.

L'importation de graines de coton GHB119 ne devrait pas poser de problème de coexistence au niveau des cultures de coton non transgéniques en France métropolitaine compte tenu de l'absence de celles-ci.

Les conditions de coexistence dans certains DROM-COM seraient à envisager différemment du fait d'un climat plus favorable aux repousses de coton et à la présence potentielle de cultures de cotonniers non transgéniques. Toutefois, dans l'éventualité où un échappement fortuit de graines aux alentours des voies d'importation produirait des repousses de cotonnier GHB119 à proximité de cultures de cotonniers non transgéniques, une contamination de semences par pollinisation ou en un mélange de graines à la récolte pourrait advenir. La probabilité de tels événements est faible compte tenu de la nécessité d'une étroite proximité entre les zones de culture de cotonniers et les voies d'importation, de la faible probabilité de telles repousses, considérant la rareté des conditions requises, combinée à la faible probabilité de synchronisation avec les cultures de cotonniers pour conduire à un mélange de graines, elle-même combinée à la probabilité encore plus faible d'une contamination par pollinisation compte tenu des arguments déjà apportés précédemment.

Conclusions

Au terme de l'analyse de l'ensemble des données fournies par le pétitionnaire et de données supplémentaires disponibles dans la littérature scientifique, le CS du HCB retient les points suivants :

- la probabilité d'installation d'une population férale en France métropolitaine à partir d'échappements de graines viables est considérée comme très faible. Le risque de contamination pollinique est par ailleurs nul compte tenu de l'absence de culture de cotonnier en France métropolitaine ;
- la possibilité d'installation d'une population férale dans les DROM-COM à partir d'échappements de graines viables bien que peu probable devrait cependant être prise en compte. Le risque subséquent de contamination pollinique de culture de cotonnier resterait très faible ;

Le plan de surveillance proposé par le pétitionnaire est satisfaisant.

Le CS du HCB recommande que, si elle était autorisée, la mise sur le marché du cotonnier GHB119 soit accompagnée de mesures propres à répondre au risque lié à sa possibilité de persistance dans certains DROM-COM.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION..... | 6 |
| 1. CARACTERISTIQUES DE LA PLANTE GENETIQUEMENT MODIFIEE | 6 |
| 1.1. OBJECTIF RECHERCHE – TRANSGENES ET FONCTIONS VISEES | 6 |
| 1.2. CARACTERISATION MOLECULAIRE ET GENETIQUE DU COTONNIER GHB119 | 8 |
| 1.3. METHODE DE TRANSFORMATION..... | 9 |
| 1.4. CARACTERISTIQUES DU COTONNIER GHB119..... | 9 |
| 2. EVALUATION DES RISQUES POUR LA SANTE HUMAINE ET ANIMALE..... | 13 |
| 2.1. RISQUES SANITAIRES ASSOCIES A LA CONSOMMATION | 13 |
| 3. EVALUATION DES RISQUES POUR L'ENVIRONNEMENT | 14 |
| 3.1. ÉVALUATION DU POTENTIEL DE DISPERSION ET SES CONSEQUENCES..... | 14 |
| 3.2. INTERACTION AVEC LES ORGANISMES CIBLES | 19 |
| 3.3. INTERACTION AVEC LES ORGANISMES NON-CIBLES | 19 |
| 3.4. IMPACTS SUR LES PROCESSUS BIOGEOCHIMIQUES ET L'ENVIRONNEMENT ABIOTIQUE | 20 |
| 4. PLANS DE SURVEILLANCE POST-COMMERCIALISATION..... | 20 |
| 4.1. PLAN DE SURVEILLANCE SPECIFIQUE..... | 21 |
| 4.2. PLAN DE SURVEILLANCE GENERALE..... | 21 |
| 5. COEXISTENCE DES FILIERES..... | 23 |
| 5.1. COEXISTENCE..... | 24 |
| 6. CONCLUSIONS | 24 |
| 7. BIBLIOGRAPHIE | 25 |
| ANNEXE 1 : SAISINE..... | 29 |
| ANNEXE 2 : ELABORATION DE L'AVIS..... | 30 |

Introduction

- Saisine et dossier :

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 5 novembre 2015 par les autorités compétentes françaises (le ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt) d'une demande d'avis relative au dossier EFSA-GMO-NL-2011-96⁷.

Déposé le 28 octobre 2011 par la société Bayer CropScience AG.⁸ auprès des autorités compétentes néerlandaises au titre du règlement (CE) n° 1829/2003⁹ (EC, 2003a), ce dossier est une demande d'autorisation de mise sur le marché du coton génétiquement modifié GHB119 à des fins d'importation, transformation et alimentation humaine et animale dans l'Union européenne.

- Contexte :

Au moment de la rédaction de cet avis, le dossier était toujours en cours d'évaluation par l'EFSA.

- Objectif de l'avis :

L'objectif de cet avis est d'éclairer les autorités compétentes françaises en perspective d'un vote des Etats membres sur un projet de décision relatif à l'autorisation de mise sur le marché du coton GHB119 dans l'Union européenne pour les usages spécifiés dans le dossier EFSA-GMO-NL-96.

1. Caractéristiques de la plante génétiquement modifiée

1.1. Objectif recherché – transgènes et fonctions visées

Le Cotonnier GHB119 exprime le gène cry2Ae isolé de la bactérie *Bacillus thuringiensis* subsp. *dakota* (*B.t. dakota*) codant la protéine insecticide Cry2Ae. Ce gène a été modifié de manière à adapter l'usage des codons à une expression dans les cellules de plantes. De plus une séquence codant un peptide d'adressage a été ajoutée en 3' afin de diriger la protéine vers le chloroplaste. Le cotonnier GHB119 exprime en outre le gène bar isolé de *Streptomyces hygroscopicus* codant la Phosphinothricin-Acetyl-Transferase (PAT) conférant une résistance aux herbicides de type glufosinate d'amonium.

La protéine Cry2Ae présente 90% d'identité avec la protéine Cry2Aa (Arnaut et al., 2002) produite par la souche de *B. thuringiensis* HD1 qui est le principe actif du biopesticide Dipel® le plus utilisé dans le monde depuis une cinquantaine d'années. Ces protéines, plus petites que les protéines de type Cry1, sont composées d'environ 630 acides aminés (71 kDa). A l'exception de la protéine Cry2Aa qui est toxique à la fois pour certains diptères et certains lépidoptères, les toxines Cry2 ne sont toxiques que pour un nombre limité d'insectes appartenant à l'Ordre des lépidoptères (Dankocsik et al., 1990; van Frankenhuyzen, 2009). La protéine Cry2Ae est quant à elle toxique pour les larves de plusieurs espèces de lépidoptères tels que *Heliothis* (ou *Helicoverpa*) *armigera*, *Heliothis zea*, *Heliothis virescens* et *Spodoptera frugiperda* qui sont des ravageurs du cotonnier, ainsi que pour des larves d'autres

⁷ La saisine HCB - dossier NL-2011-96 est reproduite dans l'Annexe 1.

⁸ La société Bayer CropScience AG est désignée comme « le pétitionnaire » dans cet avis.

⁹ Règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés. Plus précisément, pour clarifier une confusion inhérente à la traduction française de ce titre, ce règlement concerne les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, ces denrées alimentaires ou aliments pouvant consister en des OGM, contenir des OGM, ou être issus d'OGM.) : <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003R1829:FR:HTML>.

lépidoptères ravageurs de cultures tels que *Ostrinia nubilalis*, *Anticarsia gemmatalis* et *Sesamia nonagrioides* (Arnaut et al., 2002; Caccia et al., 2010; van Frankenhuyzen, 2009; Gouffon et al., 2011). Bien que la séquence peptidique des toxines Cry2 soit très distante de celle des toxines Cry1, la structure tridimensionnelle de la protéine Cry2Aa est très proche de celle des protéines Cry1 et appartiennent comme celles-ci à la famille des toxines Cry à trois domaines (de Maagd et al., 2003; Morse et al., 2001). Cette homologie de structure suggère un mode d'action comparable : deux domaines de la toxine active sont impliqués dans l'interaction avec un récepteur, et un troisième domaine est responsable de la formation de pores dans les cellules de l'épithélium intestinal des hôtes sensibles (Soberon et al., 2009). Compte tenu des similarités de séquences existantes entre les toxines Cry2, notamment entre les toxines Cry2Aa et Cry2Ae, on peut en déduire que cette dernière a le même mode d'action que les autres protéines Cry à trois domaines.

Les premières études sur le mode d'action d'une protéine Cry2A suggéraient qu'une interaction de la protéine Cry2Ab2 sur les cellules de l'intestin des larves d'insecte était nécessaire pour aboutir à la formation de pores (English et al., 1994). Depuis, plusieurs expériences ont démontré que les différentes toxines de type Cry2, dont la protéine Cry2Ae, reconnaissent des récepteurs spécifiques sur les vésicules de bordure en brosse (BBMV) de l'épithélium intestinal des larves d'insectes cibles comme *H. armigera*, *H. zea* ou *H. virescens* (Caccia et al., 2010; Gouffon et al., 2011; Hernández-Rodríguez et al., 2008). Ces récepteurs ne sont pas caractérisés, mais des expériences de compétition indiquent qu'ils sont différents de ceux reconnus par les protéines Cry1 (Hernández-Rodríguez et al., 2013), ce qui rend les protéines Cry2 intéressantes pour une stratégie de type « pyramidage ».

Bien que le mode d'action des toxines Cry2 ait été beaucoup moins étudié que celui des toxines Cry1, on peut déduire de l'ensemble des données acquises sur ces protéines, et notamment sur la toxine Cry2Ae, que leur activité contre les larves de certains insectes lépidoptères requiert la reconnaissance d'au moins un récepteur membranaire spécifique, ce qui conduit à la formation de pores et à la lyse des cellules de l'intestin moyen. Cette propriété suggère que la protéine Cry2Ae est sans danger pour les arthropodes non cibles, les plantes, les animaux et l'homme.

Le caractère de résistance à certains lépidoptères sera en outre à considérer dans les DROM-COM en termes d'avantage sélectif pour les repousses de graines de coton GHB119.

Les herbicides utilisant le glufosinate d'ammonium comme principe actif inhibent la glutamine synthétase, une enzyme jouant un rôle clé dans l'assimilation de l'ammonium et dans la régulation du métabolisme de l'azote chez les plantes. La protéine PAT inactive le glufosinate d'ammonium en l'acétylant. Le glufosinate d'ammonium est susceptible d'être utilisé sur les cultures de coton GHB119 des pays tiers exportateurs. Le caractère de tolérance au glufosinate d'ammonium sera en outre à considérer en Europe en termes d'avantage sélectif de repousses de graines de coton GHB119 viables en présence de glufosinate d'ammonium¹⁰.

¹⁰ Le glufosinate d'ammonium est actuellement autorisé en France pour le défanage de pommes de terre, l'épamprage de la vigne, et les traitements généraux de désherbage en zones de culture, sur cultures installées ou avant plantation. Aucun usage en zones non agricoles n'est autorisé. (<http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>, consulté le 22 novembre 2015.)

1.2. Caractérisation moléculaire et génétique du cotonnier GHB119

- Construction génétique

La construction génétique à l'origine du cotonnier GHB119 est portée par le plasmide pTEM12. Ce

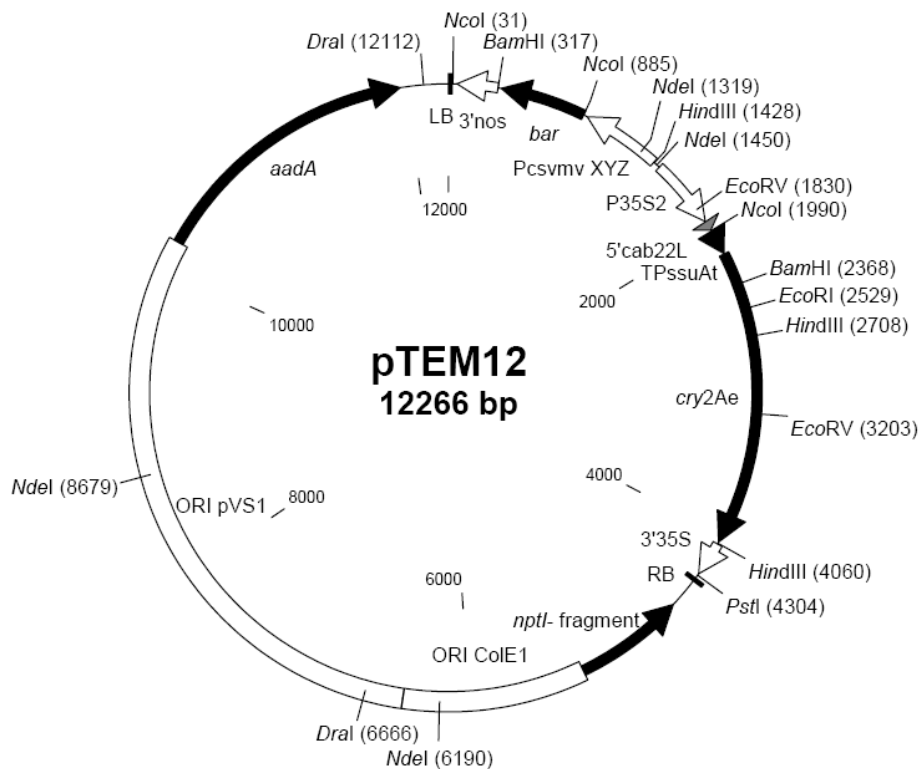


Figure 1: carte du plasmide pTEM12

plasmide contient les éléments génétiques suivant (Figure 1)

- Sur la partie du vecteur non destinée au transfert dans la plante :
 - un fragment résiduel du plasmide pTiAch5 de 191pb¹¹ flanquant la bordure droite du T-DNA
 - l'origine de réplication ColE1 provenant du plasmide pBR322 (ORI ColE1)
 - l'origine de réplication pVS1 provenant du plasmide pVS1 (ORI pVS1)
 - le gène *aadA* codant l'aminoglycoside adényltransferase, enzyme conférant la résistance à la streptomycine et à la spectinomycine
 - un fragment résiduel du gène *nptI* codant la néomycine phosphotransférase
 - un fragment résiduel du plasmide pTiAch5 de 304pb flanquant la bordure gauche du T-DNA
- Sur la partie du vecteur destinée au transfert des gènes *cry2Ae* et *bar* dans la plante :
 - la bordure gauche du T-DNA d'*Agrobacterium tumefaciens* (LB)

¹¹ pb : paires de base d'ADN

- la cassette d'expression du gène *cry2Ae*
 - P35S2 : promoteur du transcript 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur
 - 5'cab22L : séquence « leader » du gène codant la protéine de liaison à la chlorophylle a/b du pétunia
 - TPssuAt : peptide d'adressage au chloroplaste de la petite sous-unité de la ribulose-1,5-biphosphate carboxylase d'*Arabidopsis thaliana*
 - *cry2Ae* : séquence codante optimisée pour l'expression *in planta* de la protéine insecticide CryA2e
 - 3'35S : terminateur du transcript 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur
- la bordure droite du T-DNA (RB)
- la cassette d'expression du gène *bar*
 - Pcsvmv XYZ : séquence promotrice issue du virus de la mosaïque du manioc (CVMV)
 - *bar* : séquence du gène *bar* codant l'enzyme phosphinothricin acetyltransferase
 - 3'nos : terminateur du gène *nos* provenant du T-DNA du pTiT37

1.3. Méthode de transformation

L'événement de transformation GHB119 a été obtenu par transformation de cals embryogénétiques par *Agrobacterium tumefaciens*. La sélection des régénérants génétiquement modifiés a été réalisée par sélection sur le caractère de résistance à l'herbicide.

1.4. Caractéristiques du cotonnier GHB119

- Caractérisation moléculaire et génétique

Nombre de sites d'insertion et de copies des transgènes, structure de l'insert

Des analyses d'hybridation par Southern Blot ont été réalisées sur l'ADN génomique du cotonnier GHB119 (variété FM966). L'ADN de cotonnier non transgénique de la variété « FM966 » a été utilisé en contrôle négatif. L'ADN du cotonnier non transgénique « FM966 » additionné en proportion équimolaire à l'ADN du plasmide pTEM12 a été utilisé en contrôle positif. Les résultats des hybridations réalisées avec 7 sondes correspondant à des sous-parties du T-DNA ou le T-DNA complet sont présentés suite à la digestion de l'ADN génomique par l'enzyme *EcoRV*. En sus, les résultats d'hybridation de l'ADN génomique du cotonnier GHB119 digéré avec 9 autres combinaisons d'enzymes de restrictions sont également présentés avec ces mêmes sondes mais sans digestion et migration des ADN contrôles digérés par ces mêmes enzymes. **Il ressort de cette analyse que l'événement présent dans le cotonnier GHB119 correspond à une insertion unique du T-DNA.**

L'amplification PCR et le séquençage du locus intégré confirment que 4302 bp correspondant à la séquence du T-DNA ont été intégrées dans le génome du cotonnier GHB119. En sus, 1019 bp de la séquence flanquante en 5' et 1026 bp de la séquence flanquante en 3' ont été déterminées.

Séquence de l'insert

Le séquençage de 2053 pb au locus de préinsertion, obtenues suite à l'amplification PCR d'ADN génomique de cotonnier non transgénique (variété Coker 312), montre qu'une délétion de 8 pb est présente au locus d'insertion.

Le pétitionnaire reporte en outre que des hybridations ont été réalisées avec 6 sondes correspondant au vecteur et qu'aucune hybridation n'a été observée avec l'ADN génomique du cotonnier GHB119 (variété coker 312) indiquant qu'aucun élément la partie vecteur n'a été intégré dans l'événement GHB119. La référence citée (Habex, 2011 M- 308404-03-1) ne décrit pas ces expérimentations, cependant les données sont présentées dans la référence (Moens 2008 M-311127-01-1).

Séquençage des régions flanquantes et analyse bioinformatique

Des régions de 1019 pb en 5' de l'insertion principale et 1026 pb en 3' de l'insertion principale ont été séquencées en sus du T-DNA sur l'ADN génomique de l'événement GHB119. Les résultats obtenus ont été comparés aux séquences obtenues suite à des amplifications des régions réalisées sur de l'ADN génomique extrait du cotonnier non transgénique Coker 312. **Ceci confirme qu'une délétion de 8 pb s'est produite au site d'insertion du T-DNA.**

Analyse bioinformatique des ORFs¹² potentiels dans l(es) insert(s) et ses/leurs jonctions

Les programmes Transcription Start Site Prediction (TSSP), GETorf and FGENESH ont été utilisés respectivement pour repérer des promoteurs potentiels, des ORFs d'une taille minimum de trois acides aminés au niveau des jonctions et de huit acides aminés en dehors des sites de jonctions ainsi que des gènes potentiellement exprimés. La présence d'ARNs correspondant aux ORFs potentiels n'a pas été recherchée.

Le programme TSSP prédit 6 promoteurs potentiels sur la séquence non transgénique : l'un d'entre eux est interrompu par l'insertion du T-DNA tandis que 9 promoteurs potentiels ont été prédits sur la séquence transgénique. L'un de ces promoteurs est localisé dans la région où un promoteur a été interrompu par l'insertion.

Le programme GetOrf prédit 11 nouvelles ORFs d'une taille minimale de trois acides aminés aux points de jonction des loci transgéniques alors que 6 ORFs interrompues ont été identifiées dans les séquences non transgéniques. Dans les séquences insérées, 192 ORFs d'une taille minimale de huit acides aminés ont été identifiées. Aucune homologie entre ces ORF et des protéines toxiques ou allergènes n'a respectivement été identifiée dans la base de donnée « toxine » de Bayer et dans la base de données AllergenOnline (www.allergenonline.org). De plus aucun transcrite n'a été détecté par Northern blot à l'exception des transcrits correspondant aux gènes *cryA2e* et *bar*.

Le programme FGENESH ne prédit pas de gène dans les séquences non transgéniques. Dans la séquence transgénique insérée, ce programme prédit correctement le gène *cry2Ae*, cependant, la prédiction du gène *bar* est dépendante du set d'entraînement utilisé (tomate, medicago, arabidopsis).

Une recherche par BLAST réalisée sur les séquences non transgéniques ne révèle pas d'homologie de séquence avec des gènes de cotonnier connus.

¹² ORF (Open Reading Frame) : cadre ouvert de lecture, détecté par des programmes informatiques, correspondant à une séquence d'ADN qui peut coder, si elle est préalablement transcrite, un peptide ou une protéine. Des analyses supplémentaires sont nécessaires pour tester si un ORF potentiel ainsi détecté est effectivement transcrite en ARN et traduit en peptide ou protéine.

En conclusion, il n'y a pas de preuve qu'un gène endogène du cotonnier ait été interrompu par l'événement de transformation générateur du cotonnier GHB119.

Stabilité et héritabilité des transgènes et de leur phénotype

Les plantes T1, ont été croisées avec la variété conventionnelle FM966. L'analyse par Southern Blot, en utilisant comme sonde le T-DNA, réalisée à la 2^{ème} et 3^{ème} génération a confirmé l'intégrité et la stabilité génétique de l'insertion. Le même type d'analyse a été effectué sur l'ADN de plantes ayant poussé dans 6 localités différentes confirmant la stabilité de l'insert.

Par ailleurs, la ségrégation du caractère de résistance à l'herbicide a été évaluée suite à des croisements avec trois variétés différentes (FM966, MS88, 97201).

En conclusion, les analyses effectuées sont en accord avec une héritabilité mendélienne d'un locus unique.

Expression des transgènes et des protéines

Les gènes *cryA2e* et *bar* sont respectivement sous le contrôle des promoteurs 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur et du promoteur du virus de la mosaïque du manioc qui permettent une expression constitutive des transgènes.

L'expression des transcrits a été visualisée par Northern blot. Le transcrit *cryA2e* (environ 2600 nucléotides) est détecté dans tous les tissus du cotonnier GHB119. Deux transcrits *bar*, d'une taille de 900 nucléotides et 1300 nucléotides ont été détectés dans tous les tissus à l'exception du pollen. Le transcrit de 1300 nucléotides est moins abondant, il dérive d'un « *read through* » incluant le terminateur 3' et la jonction.

Les niveaux d'expression des protéines CryA2e et PAT ont été quantifiés par ELISA en utilisant des anticorps polyclonaux. Cette quantification a été effectuée sur les feuilles, les tiges, les racines et graines de plantes transgéniques GHB119 (variété Coker 312) cultivés en serre ayant reçu une application de glufosinate, à différents stades de croissance. Les résultats montrent que la protéine PAT est exprimée dans tous les tissus analysés et que la protéine CryA2e est exprimée dans tous les tissus à l'exception du nectar. Les teneurs sont maximales dans les tissus en croissance (stade 1): 100 µg/g de poids sec et 110 µg/g de poids sec dans les racines et les feuilles pour la protéine PAT, 16,9 µg/g de poids sec et 37,5 µg/g de poids sec dans les racines et les feuilles pour la protéine CryA2e. Pour la plante entière, les teneurs quantifiées au stade 3 de croissance sont respectivement de 50,9 µg/g de poids sec pour PAT et 30,4 µg/g de poids sec pour CryA2e.

De plus la quantification ELISA a aussi été réalisée sur les graines récoltées suite aux essais en champs réalisés en 2006 aux Etats-Unis (6 sites) en 2007 en Espagne (Andalousie (6 sites) et Catalogne (2 sites)). Les essais ont été pulvérisés ou non avec l'herbicide glufosinate. Il n'y a pas de différences significatives entre les essais traités aux herbicides et ceux non traités au glufosinate. Les résultats obtenus sont les suivants (en µg/g de poids frais) :

| | CryA2e (µg/g de poids frais) | | PAT (µg/g de poids frais) | |
|-----------------|------------------------------|--------------|---------------------------|------------|
| | Non traité* | Traité | Non traité* | Traité |
| USA 2006 | 1,55 ± 0,19 | 1,47 ± 0,007 | 50 ± 4.1 | 49,9 ± 3.5 |
| Andalousie 2007 | 3,18 ± 0,32 | 3,26 ± 0,45 | 114 ± 25 | 117 ± 25 |
| Catalogne 2007 | 2,00 ± 0,07 | 1,84 ± 0,1 | 123 ± 20 | 102 ± 0,3 |

*En Espagne, les essais non traités glufosinate ont reçu un traitement conventionnel.

En conclusion, à l'exception du nectar, tous les tissus, à tous les stades de croissance testés, expriment les protéines CryA2e et PAT à des niveaux variables selon le tissu. On n'observe pas de différence significative liée au traitement herbicide. Le pétitionnaire ne mentionne pas d'effet site mais les teneurs observées au niveau des graines sont en moyenne deux fois plus importantes en Espagne qu'aux Etats-Unis.

- Caractérisation phénotypique du cotonnier GHB119

Evaluation du choix des comparateurs et du dispositif expérimental mis en œuvre

Les schémas de croisement ont conduit à la création de lignées homozygotes transgéniques GHB119 pour les variétés « Coker 312 » et « FM966 » selon le schéma suivant (figure 2) :

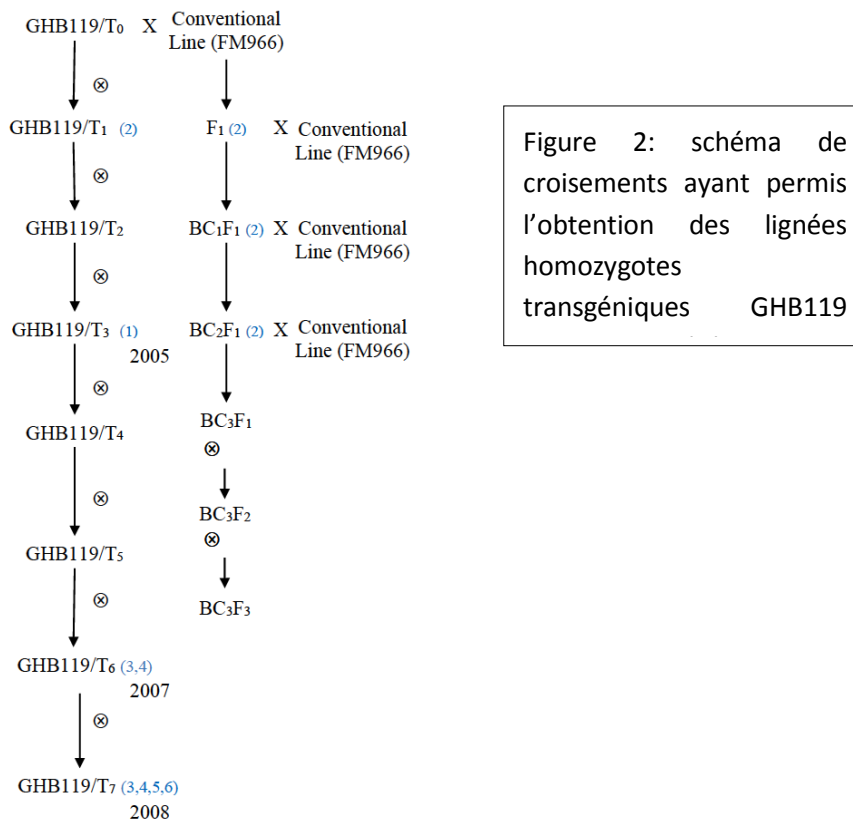


Figure 2: schéma de croisements ayant permis l'obtention des lignées homozygotes transgéniques GHB119

Pour les essais au champ, la lignée de cotonnier GHB119 « Coker 213 » a été comparée à son équivalent non génétiquement modifié « Coker 312 ». Les essais ont été effectués aux Etats-Unis (2006), et en Espagne (2007 et 2008).

Les essais au champ ont été conduits en Espagne (Catalogne et Andalousie) sur un total de 31 sites (16 localités) sur 3 années (2007, 2008, 2009). Dans chaque localité, l'essai était constitué d'un dispositif en 4 blocs complets randomisés avec 3 répétitions (Catalogne) et 5 répétitions (Andalousie). Sont comparées la condition GHB119 non traitée, la condition GHB119 traitée au glufosinate et la condition coker 312. Chaque bloc fait 53,2 m² (7*7,6 m), les lignes de semis (6 par bloc) sont écartées de 0.95 m. Chaque ligne mesure environ 7.6 mètres. Six rangs de coton séparent chaque bloc. L'ensemble des pratiques (préparation du sol, fertilisation et irrigation) a été réalisé suivant les pratiques habituelles. La densité de semis est de 18 000 graines à l'hectare. Les récoltes ont été faites manuellement.

Dans chaque site, différents traits agronomiques ont été mesurés et comparés entre la PGM et le contrôle concernant le comportement au champ (germination, croissance de la variété) les performances agronomiques (fécondité, rendement), la qualité de la fibre de coton et le comportement face aux maladies.

Résultats de l'analyse « agronomique et phénotypique »

L'analyse statistique des données a montré des différences entre la variété PGM GHB119 et la variété non-transgénique Coker 312 pour un certain nombre de paramètres de croissance et des caractéristiques de qualité de la fibre. L'insertion des gènes bar et cry2Ae ne modifie pas la susceptibilité de la variété aux maladies.

D'un point de vue biologique et agronomique, les différences sont statistiquement très faibles. Les différences absolues sont petites par rapport à la variation naturelle de la variété (tableau 21 – p.74) ce qui est correct au regard des données dans l'article (mais ce qui n'empêcherait pas qu'elles puissent être significatives).

Le nombre et le choix des sites d'essais sont corrects. Le dispositif expérimental (taille des parcelles, nombre d'années d'étude, nombre de sites) est correct. Les différences significatives qui sont observées entre la variété OGM et la variété contrôle sont d'un ordre de grandeur faible et sont comprises dans la variabilité observée pour les variétés commerciales de coton (attribuées à un effet site). La conclusion du pétitionnaire quant à l'absence de différence agronomique entre la variété PGM GHB119 et la variété non-transgénique utilisée comme contrôle est valide.

Résultats de l'analyse de composition

Dans son avis émis le 4 février 2012 (saisine 2011-SA-0 323)¹³, l'Anses considère qu'au regard de l'ensemble des éléments fournis par les pétitionnaires dans le dossier initial, les résultats de l'analyse comparative de la composition chimique des graines de cotonniers GHB119 et des graines de cotonniers témoin ne font pas apparaître de différence de composition. Il en est de même pour les principaux produits dérivés de la graine, mais la comparaison a été réalisée avec un autre témoin que l'isogénique.

Enfin, l'étude sur la composition des tourteaux, telle que réalisée, ne permet pas de conclure à une absence de différence de composition entre les tourteaux GHB119 et les tourteaux témoin.

Le CS du HCB prend acte des résultats de cette évaluation.

2. Evaluation des risques pour la santé humaine et animale

2.1. Risques sanitaires associés à la consommation

Règlement (CE) N°1829/2003 (EC, 2003a).

Les risques pour la santé humaine et animale associés à la consommation des produits issus du cotonnier GHB119 ont été évalués par l'Anses dans le cadre d'une saisine de la DGCCRF (Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des Fraudes). Dans son expertise rendue le 4 février 2012 (saisine 2011-SA-0 323)¹³ l'Anses considère que les données fournies permettent d'évaluer la sécurité des protéines nouvellement présentes dans les

¹³ Anses – Saisine n°2011-SA-0 323. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à un dossier de demande de mise sur le marché, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003, du 4 avril 2012 pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM.

cotonniers génétiquement modifiés GHB119. Par ailleurs, une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours ne met pas en évidence de toxicité liée à la consommation de tourteaux de cotonniers testés. Toutefois, l'information selon laquelle le matériel végétal testé provient de cotonniers traités ou non par le glufosinate ammonium n'est pas fournie.

Concernant l'évaluation nutritionnelle, compte tenu de l'absence de justification du faible taux d'incorporation de tourteaux dans la ration et de la mortalité élevée observée dans tous les groupes, sans différence significative entre les animaux nourris avec les plantes GM et ceux nourris avec les plantes témoin, l'Anses a jugé l'étude non recevable.

En conclusion et en l'absence, notamment, d'une étude nutritionnelle jugée recevable, l'Anses n'a pu conclure quant à la sécurité sanitaire liée à la consommation des cotonniers portant l'événement GHB119 et de leurs produits dérivés.

Le CS du HCB prend acte des résultats de cette évaluation.

3. Evaluation des risques pour l'environnement

L'évaluation des risques pour l'environnement associés aux différentes utilisations envisagées du cotonnier GHB119 concerne son potentiel de dispersion, ses éventuelles interactions avec les organismes cibles et non-cibles, ses impacts sur les processus biogéochimiques et l'environnement abiotique, et d'autres impacts indirects sur l'environnement.

Ces risques seront évalués à l'aune de la nature et du degré de l'exposition de l'environnement au cotonnier GHB119 et aux produits de ses transgènes. Ce dossier concernant une demande de mise sur le marché du coton GHB119 pour l'importation, la transformation, et l'alimentation humaine et animale, seront considérés les conséquences d'une dispersion dans l'environnement du cotonnier GHB119 et/ou des transgènes à partir du coton importé sont prises en considération.

3.1. Evaluation du potentiel de dispersion et ses conséquences

Une dispersion (ou dissémination involontaire) des transgènes pourrait provenir d'une dispersion de graines ou d'un transfert de gène(s) par croisement avec d'autres plantes ou par transfert horizontal à des microorganismes.

La dispersion des transgènes n'est pas, en elle-même, considérée comme un risque pour l'environnement, mais ses conséquences sur l'environnement (en termes, par exemple, d'interaction avec les organismes non-cibles, ou d'impact sur les pratiques agricoles en cas de repousses persistantes et envahissantes ou de flux de gènes vers des adventices) peuvent constituer un risque pour l'environnement et sont évaluées comme telles dans cet avis. Au-delà des risques pour l'environnement, la dispersion des transgènes est également considérée dans le cadre de la coexistence.

- Dispersion de graines et établissement de populations férales ou envahissantes¹⁴ :

La dispersion de graines est possible pendant le transport suite à une importation. Des événements de dispersion de graines et d'établissement de plantes ont été observés en Corée aux abords des ports

¹⁴ Une **population férale** est une population issue des grains d'une variété cultivée qui se sont dispersés en dehors des parcelles cultivées, ont pu y germer et s'y reproduire pour former une population démographiquement stable (Kos et al., 2012). Lorsque ces populations se propagent non plus seulement à proximité des milieux agricoles mais envahissent aussi les milieux naturels, on parle de **populations envahissantes**.

d'importation, le long des routes empruntées par les camions ainsi qu'à proximité des usines de transformation (Han et al., 2015; Park et al., 2010) pour le maïs. La dispersion de grains via les fèces d'animaux (endozoochorie) en ayant consommé est également à considérer cela ayant déjà été observé en Australie (Australian Government, OGTR, 2008).

Une étude australienne montre qu'en dessous de 11°C, la croissance végétative est fortement ralentie mais peut repartir si la température remonte (McDowell et al., 2007). Une étude plus ancienne montre également qu'une température inférieure à 4° entraîne des lésions létales sur les tissus (Rikin et al., 1979). Il est indiqué, par le pétitionnaire, que dans des conditions climatiques où la température du sol descend au-dessous de 15° les graines pourrissent, ceci correspond aux études menées dans ce domaine. Les variétés améliorées ont, d'une façon générale, été sélectionnées pour être cultivées annuellement à la différence des cotonniers ancestraux pérennes. **Dans le cas où des graines viables de variétés améliorées viendraient à être dispersées, il est donc peu probable que sans intervention humaine et dans des conditions naturelles une population férale puisse s'installer de manière pérenne en France métropolitaine.**

La situation est cependant différente dans les DROM-COM où l'éventualité de germination de graines échappées ne peut être totalement exclue même si elle demeure assez faible. L'installation accidentelle de cotonniers OGM persistants doit être prise en considération. **Il est envisageable que des populations de cotonniers OGM puissent s'installer dans les RUP et les DROM-COM. Ceci n'est pas considéré dans la demande. Le plan de surveillance (monitoring) doit être revu en conséquence.**

Suite à une dispersion involontaire de graines se pose la question du potentiel de persistance et du caractère envahissant de la PGM dans l'environnement, en zones agricoles ou non-agricoles. Selon les données de l'analyse comparative, aucune différence agronomique et phénotypique autre que les caractères intentionnels liés aux transgènes n'a été détectée entre la variété de cotonnier GHB119 et son comparateur non-transgénique.

La protéine PAT confère au cotonnier GH119 une tolérance aux herbicides à base de glufosinate. L'herbicide glufosinate d'ammonium est homologué en France pour un usage en traitements généraux de désherbage avant mise en culture ainsi que sur pomme de terre en défanage¹⁵, l'utilisation de l'herbicide glufosinate d'ammonium pourrait donc conférer un avantage sélectif au cotonnier GHB119 s'il venait à se répandre accidentellement dans des parcelles cultivées. La gestion de ces contaminations devra évidemment exclure l'emploi d'herbicides à base de glufosinate d'ammonium.

Du fait de la présence de ces ravageurs dans certains DROM-COM (Antilles et Guyane en particulier), les transgènes présents dans la variété GHB119 sont susceptibles de conférer un avantage sélectif.

Enfin, l'avantage sélectif potentiellement conféré par les transgènes semble très faible en milieu naturel, du fait de l'absence (glufosinate d'ammonium) ou de la faible présence (insectes ravageurs) des pressions de sélection correspondantes dans ces milieux.

Le CS du HCB note par ailleurs que si la germination, la floraison et le maintien d'une population férale de cotonnier est très peu probable en France métropolitaine, cela reste possible dans d'autres pays de l'Union européenne par ailleurs producteurs de coton comme l'Espagne, la Grèce ou la Bulgarie. Le développement de repousses et l'établissement de telles populations férales pourraient avoir un

¹⁵ Voir : <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/> et <http://www.bayer-agri.fr/produits/fiche/basta-f1/>.

impact négatif sur les capacités de coexistence lors de l'importation dans des pays de l'UE cultivateurs de coton.

- Potentiel de transfert de gènes par le pollen :

Dans la mesure où la demande ne concerne pas la mise en culture de GHB119, la contamination pollinique ne peut être envisagée qu'après implantation de populations de cotonniers GHB119 liée à des graines viables directement importées ou qui auraient, dans un premier temps, échappé aux processus de transformation post-récolte et qui dans un second temps, auraient été disséminées accidentellement après importation. Si cet enchaînement venait à se produire en France métropolitaine, même dans le sud du territoire et dans la période climatique propice à la culture du cotonnier, il est difficile d'imaginer qu'ensuite, et au regard de ce qui a été décrit précédemment des populations de cotonniers puissent s'implanter naturellement. La contamination pollinique ne peut avoir lieu que si des graines viables, échappées accidentellement, venaient à germer et produire des plantes susceptibles de parvenir à maturité.

Toutes les variétés de *Gossypium* sont autofertiles mais peuvent être pollinisées par des insectes (Thies, 1953). Le pétitionnaire note qu'en l'absence d'insectes pollinisateurs le coton est essentiellement autofécondé « *when pollinators are present, cross-pollination can be significant* ». De fait, le grain de pollen de l'espèce tétraploïde *G. hirsutu*, est trop lourd, trop grand et collant il n'est pas transporté par le vent mais il a été montré que la force et le sens du vent peuvent avoir un effet indirect en orientant augmentant de manière significative la distance parcourue par les insectes pollinisateurs, qui n'excède toutefois pas une centaine de mètres (Free, 1993; Vaissière and Vinson, 1994). Cette distance peut donc atteindre une centaine de mètres et pas seulement 30 comme cela est indiqué. De plus la capacité de pollinisation entomophile varie selon les insectes (Kareiva et al., 1994; Van Deynze et al., 2005).

Après anthèse, la viabilité pollinique est variable selon la variété considérée et les conditions environnementales. Le pollen ne peut être conservé durant de longues périodes (Govila and Rao, 1969). L'abaissement de la température permet de prolonger sa viabilité pour quelques jours (Harrison et Fulton, 1934). La germination du grain est optimale à 31°C entre 30 minutes et 8 heures après l'anthèse (Barrow, 1981, 1983; Kakani et al., 2005). Au-delà de cette période, le pouvoir germinatif chute à 30% après 24 heures et atteint à peine 1% après 32 heures. Les températures supérieures à 42°C rendent la germination impossible (Barrow, 1983).

Au-delà du genre *Gossypium*, le critère de compatibilité sexuelle interdit apparemment la possibilité de flux de gènes à partir des *Gossypium* cultivés. Toutefois, dans la littérature quelques essais ont été signalés relatifs aux hibiscus. *Abelmoschus esculentus* (Brown, 1947), avait été utilisé comme parent mâle et la plante hybridée était stérile. En Inde, (Mehetre et al., 1980) ont produit un hybride à partir d'un croisement entre *G. hirsutum* et *Hibiscus panuraeformis* Burm. L'hybride F1 présentait des irrégularités. Stewart, dans un rapport réalisé pour la firme Monsanto, a réalisé des pollinisations d'hibiscus (*Hibiscus acetosella*, *H. syriacus*), okra (*Abelmoschus esculentus*) et *Alyogyne* spp. sur du coton semi-gamétique (Stewart, 1992). Dans de nombreux cas, des graines ont été obtenues, mais les plantes résultantes étaient des cotonniers, ce qui laisse supposer que des phénomènes de parthénogenèse peuvent survenir. Dans les conditions naturelles, aucune hybridation de ce type n'a été observée à ce jour, la dispersion du pollen chez le cotonnier est donc assez variable et sa viabilité faible. Ces caractéristiques, associées au fait qu'il n'existe a priori pas de populations férales ou sauvages en Europe continentale et que, comme cela est indiqué avec raison qu'excepté dans les pays qui le cultivent, il n'y a pas en Europe continentale de plantes apparentées au coton (*Gossypium*)

susceptibles de se croiser, le risque de contamination pollinique peut être considéré comme inexistant. Dans ce contexte géographique, la demande est correctement argumentée.

Il existe en zone tropicale des conditions environnementales qui permettraient la persistance de cotonniers en cas d'échappement accidentel de graines viables. A partir de ces cotonniers il existe une possibilité d'observer des flux de gènes vers des cotonniers subspontanés, féraux ou sauvages présents à l'état pérenne dans ces régions. C'est le cas aux Antilles, en Polynésie et potentiellement en Guyane. Même, par exemple, en Guadeloupe, où des cotonniers poussent à l'état naturel hors zones de culture et dans des conditions environnementales extrêmes (en particulier pédologiques) incompatibles avec la présence de variétés améliorées. Ce risque faible ne peut être totalement exclu. L'entrée possible par la Guyane sur le continent sud-américain, zone de diversification doit également être analysée en termes de risque.

La demande est donc correctement argumentée.

- Potentiel de transfert de gènes par transfert horizontal à des bactéries environnementales du sol et impact potentiel :

L'évaluation du potentiel de transfert des transgènes à des bactéries concerne les transferts aux bactéries du sol, à partir d'éventuelles repousses de graines viables de coton échappées lors du transport, et les transferts aux bactéries intestinales, à partir de la consommation de coton GHB119.

La possibilité de transfert de gènes entre plantes transgéniques et bactéries de l'environnement a été démontrée en laboratoire sur des modèles d'étude composés de plantes transgéniques variées et de quelques bactéries naturellement transformables utilisées comme réceptrices, principalement *Acinetobacter baylii* (Gebhard and Smalla, 1998; Kay et al., 2002; Pontiroli et al., 2009; Rizzi et al., 2008).

Les premiers travaux en conditions simulant l'environnement (Kay et al., 2002) montrent qu'une plante soumise à une attaque par un pathogène devient colonisable par d'autres bactéries y compris par des microorganismes capables de développer un stade de compétence et d'acquérir les gènes de la plante. La plante en décomposition (résidusphère) constitue également un écosystème extrêmement favorable à l'acquisition de gènes de la plante GM par les bactéries du sol qui le colonisent (Pontiroli et al., 2009; Rizzi et al., 2008). Comme dans le cas de la plante infectée par un pathogène, la décomposition du matériel végétal contribue à la libération de l'ADN au contact de bactéries métaboliquement très actives du fait des nutriments ce qui leur permet de développer un stade de compétence.

Cette possibilité de transfert de l'ADN du transgène est liée à la présence de séquences procaryotiques qui peuvent être intégrées par recombinaison homologue ou homéologue dans les régions de forte similarité nucléotidique présentes dans les génomes bactériens à des fréquences significatives, donc détectables. Signalons qu'en théorie les autres séquences typiquement végétales des génomes des plantes OGM pourraient également être intégrées dans les génomes bactériens par recombinaison illégitime mais, à des fréquences extrêmement faibles, de telles séquences, généralement non exprimées, n'étant que très exceptionnellement fixées dans ces génomes.

Pour évaluer les potentialités de transfert du transgène de la plante étudiée aux bactéries de l'environnement il convient donc en premier lieu de rappeler la structure de ce transgène et l'origine des gènes et des séquences qui le composent.

Le cotonnier GHB119 exprime le gène *cry2Ae* isolé de la bactérie *Bacillus thuringiensis* subsp. *dakota* (*B.t. dakota*) codant la protéine insecticide Cry2Ae. Ce gène a été modifié de manière à adapter l'usage des codons à une expression dans les cellules de plantes. De plus une séquence codant un peptide d'adressage a été ajoutée afin de diriger la protéine vers le chloroplaste. Le cotonnier GHB119 exprime en outre le gène *bar* isolé de *Streptomyces hygroscopicus* codant la Phosphinothricin-Acetyl-Transferase (PAT) conférant une résistance aux herbicides de type glufosinate. L'événement présent chez le cotonnier GHB119 résulte de la transformation de callus d'embryogénèse de la variété Coker 312 à l'aide de la souche *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 désarmée contenant le plasmide pTEM12 porteur de l'ADN-T à transférer. Le cotonnier GHB119 ne contient qu'une seule copie de l'insert.

Un transfert d'ADN réalisé par amorçage de la recombinaison sur les régions de totale similarité entre ADN donneur (transgène) et génome récepteur (bactérien) comme ce pourrait être le cas avec les séquences procaryotiques issues de *Bacillus thuringiensis* et *Streptomyces hygroscopicus* mentionnées ci-dessus pourrait aboutir potentiellement au co-transfert des régions adjacentes (situées près des sites d'intégration du transgène) appartenant au chromosome de la plante. De tels événements ont en effet été détectés dans le cadre d'études sur un autre couple modèle de plante transgénique-bactérie réceptrice par Gebhard et Smalla (1998). Les fréquences de tels événements sont extrêmement basses. Les principales bactéries cibles pour un retour de ces différents gènes insérés dans la plante au sein du microbiote tellurique sont donc celles qui ont fourni les gènes considérés : *Bacillus thuringiensis* et *Streptomyces hygroscopicus*. Les bactéries appartenant aux genres *Bacillus* et *Streptomyces* sont abondamment représentées dans le sol ce qui accroît la possibilité d'un transfert d'ADN entre la plante transformée et les bactéries telluriques tout comme le fait que des espèces au sein du genre *Bacillus* ont été décrites comme naturellement transformables. Ce n'est par contre pas le cas pour *Streptomyces*. Cependant que de tels événements de transfert de gènes recherchés sur d'autres modèles, qu'ils concernent les séquences procaryotiques des transgènes ou les régions flanquantes n'ont jamais été observés « au champ » (Demanèche et al., 2008).

En outre, compte tenu des caractéristiques de la construction génétique, l'avantage sélectif que de tels événements de transfert pourraient conférer à une bactérie réceptrice s'ils venaient à se réaliser serait limité. Les fonctions codées par ces deux gènes : la production de toxines actives contre certains insectes et d'une enzyme impliquée dans le métabolisme bactérien (la phosphinothricin acetyltransferase) ne permettent pas de supposer que leur acquisition par une bactérie puisse accroître la valeur adaptative de la bactérie transformée ni que celle-ci acquière des potentialités particulières pour transférer ces gènes à d'autres micro-organismes.

Enfin, ces gènes ont été clonés de façon à optimiser leur expression en systèmes eucaryotes sans réelle possibilité d'expression dans les bactéries, ce qui limite encore l'impact potentiel s'ils venaient à être transférés.

Considérons cependant le cas où l'intégration dans le génome d'une bactérie se réaliserait de telle sorte que ces gènes puissent effectivement s'y exprimer. La question serait alors de savoir si la présence de bactéries ayant acquis un ou plusieurs de ces gènes à partir de la plante pourrait avoir un impact sur l'équilibre populationnel et fonctionnel de la communauté bactérienne ou en d'autres termes si un avantage adaptatif pourrait être directement associé à cet événement. La fonction codée par, ces gènes, à savoir la production de toxines actives contre les insectes et une phosphinothricine acétyltransférase, ne permet pas de supposer que leur acquisition par une bactérie puisse accroître sa valeur adaptative. Ces gènes sont d'ailleurs déjà largement présents dans le microbiote tellurique ne serait-ce que du fait que ces bactéries sont des colonisateurs performants de tous types de sols des

régions tempérées. A noter que cette plante ne contient pas de gènes de résistance à un antibiotique comme marqueur limitant encore les interrogations concernant le risque pour la santé humaine.

Enfin la présente demande ne porte pas sur la culture du cotonnier GHB119 et les éventuels transferts de gènes évoqués précédemment sont conditionnés à l'éventuel échappement de graines viables et à leur germination, événements très peu probables en France métropolitaine.

En conclusion les risques de transfert de gènes de cette plante aux bactéries environnementales sont donc extrêmement faibles et les conséquences de tels événements, s'ils venaient à se produire, négligeables pour la santé humaine ou animale et pour l'environnement.

- Transfert horizontal des transgènes au microbiote intestinal et impact potentiel :

La principale limitation pour le transfert des gènes procaryotiques du transgène aux bactéries du tube digestif est la dégradation quasi immédiate de l'ADN extracellulaire après sa libération hors des cellules de la plante (Netherwood et al., 2004). La capacité des bactéries du tube digestif à développer un stade de compétence est peu renseignée du fait de la difficulté à maintenir de l'ADN suffisamment intègre pour qu'il puisse être intégré par transformation par les bactéries indigènes de façon à y exprimer les gènes de sélection. Sans ce contrôle expérimental, il n'est pas possible de se prononcer sur la capacité physiologique de représentants du microbiote intestinal à développer un stade de compétence. Plusieurs articles confirment l'extrême difficulté pour détecter l'ADN du transgène dans différents tissus d'animaux nourris avec les plantes OGM correspondantes confirmant sa très rapide dégradation quand il se trouve à l'état extracellulaire (Jennings et al., 2003a, 2003b; Nemeth et al., 2004; Sharma et al., 2006; Zhu et al., 2004). Comme précédemment, si un tel transfert venait à se réaliser son impact sur le microbiote intestinal serait négligeable.

3.2. Interaction avec les organismes cibles

Les organismes cibles sont définis par l'EFSA comme des organismes sur lesquels les caractères spécifiques d'une plante GM sont destinés à agir ; ce sont généralement des ravageurs ou des pathogènes de la plante. Tous les autres organismes sont considérés comme des organismes non-cibles.

Ici, le cotonnier génétiquement modifié GHB119 exprime la toxine Cry2Ae qui lui confère une résistance contre des insectes ravageurs du cotonnier : *Heliothis* (ou *Helicoverpa*) *armigera*, *Heliothiszea*, *Heliothis virescens* et *Spodoptera frugiperda*. D'autres insectes pourraient éventuellement être sensibles à la toxine sans pour autant être des ravageurs du maïs ; ils sont considérés parmi les organismes « non-cibles » (voir 3.3).

Du fait du périmètre de la demande, le nombre d'insectes potentiellement exposés à la toxine est négligeable.

3.3. Interaction avec les organismes non-cibles

Via leurs interactions directes ou indirectes avec les populations d'organismes non-cibles, les plantes génétiquement modifiées pourraient affecter la biodiversité et ses fonctions écologiques. Les organismes non-cibles comprennent tous les organismes dont les populations pourraient être non intentionnellement affectées, par un mécanisme spécifique ou non spécifique, résultant de l'insertion ou de l'expression des transgènes dans la plante génétiquement modifiée.

Du fait du périmètre de la demande, le nombre d'insectes potentiellement exposés à la plante est négligeable.

3.4. Impacts sur les processus biogéochimiques et l'environnement abiotique

L'impact de la culture du cotonnier GHB119 exprimant le gène *cry2Ae* de *Bacillus thuringiensis* et la phosphinothricine acétyl-transférase de *Streptomyces hygroscopicus* sur les processus biogéochimiques et l'environnement abiotique du cotonnier est négligeable du fait de la présence naturelle des produits de ces gènes dans l'environnement et de leur innocuité sur la structure taxonomique et fonctionnelle du microbiote tellurique. Les travaux concernant le devenir des protéines Cry dans le sol et leurs interactions avec le microbiote ont été synthétisés dans un article récent (Singh and Dubey, 2015), les principales conclusions tirées de ces études étant l'impact de nul à très limité de la libération des protéines Cry par les plantes transgéniques.

La demande présente ne couvrant pas la culture mais uniquement l'importation de graines de coton, ce risque est d'autant plus limité qu'il dépend de l'éventuel échappement de graines viables et de leur germination, événements considérés comme très peu probables en France métropolitaine.

4. Plans de surveillance post-commercialisation

En matière de surveillance post-commercialisation, la directive 2001/18/CE¹⁶ (EC, 2001) complétée par les règlements (CE) 1829/2003 (EC, 2003a) et 1830/2003¹⁷ (EC, 2003b), prévoit que soient mis en place :

- un plan de surveillance spécifique, pour tester/confirmer d'éventuelles hypothèses émises lors de l'évaluation des risques pour l'environnement en ce qui concerne l'apparition et l'impact d'effets néfastes potentiels de l'OGM ou de son utilisation. Le plan de surveillance spécifique est destiné à mettre en évidence les changements prévisibles ;
- un plan de surveillance générale, pour identifier l'apparition d'éventuels effets néfastes de l'OGM ou de son utilisation sur la santé humaine ou animale ou sur l'environnement, qui n'auraient pas été anticipés lors de l'évaluation des risques pour l'environnement. Le plan de surveillance générale vise à mettre en évidence les changements non prévus par les plans de surveillance spécifique.

Le champ de l'autorisation relève du règlement (EC) No. 1829/2003.

Le plan de surveillance générale est proposé en accord avec la Directive 2001/18/EC Annexe VII et selon les lignes directrices publiées dans *The EFSA Journal* (EFSA, 2006).

Le pétitionnaire a mené un plan d'évaluation des risques environnementaux (ERA *environmental risk assessment*) pour le coton GHB119. Il en a conclu que, dans les conditions de demande d'autorisation du présent dossier, les risques étaient négligeables pour :

- la persistance et le caractère invasif,

¹⁶ La directive 2001/18/CE est une directive du Parlement européen et du Conseil du 12 mars 2001 qui fixe les règles communautaires relatives à la dissémination volontaire d'OGM dans l'environnement. Elle abroge la directive 90/220/CEE du Conseil. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32001L0018:FR:HTML>.

¹⁷ Le règlement (CE) 1830/2003 est un règlement du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant la traçabilité et l'étiquetage des organismes génétiquement modifiés et la traçabilité des produits destinés à l'alimentation humaine ou animale produits à partir d'organismes génétiquement modifiés, et modifiant la directive 2001/18/CE. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003R1830:FR:HTML>.

- le transfert de gènes,
- l'activité du coton transgénique sur les organismes cibles,
- l'activité du coton transgénique sur les organismes non cibles,
- l'impact sur les pratiques et techniques agricoles,
- les effets géochimiques et l'interaction avec la sphère abiotique,
- les effets sur la santé humaine et animale.

Le CS du HCB considère que les conclusions de cette évaluation des risques environnementaux sont justifiées par l'absence de demande de culture du coton GHB119 et l'absence de culture de coton (GM ou non GM) en France métropolitaine.

En conséquence, le pétitionnaire considère, à juste titre, qu'il n'y a pas lieu de mettre en place un plan de surveillance spécifique, mais de mettre en œuvre une surveillance générale pour l'importation, la transformation pour des usages de l'alimentation animale ou humaine ou non alimentaires, à l'exclusion d'une mise en culture.

Le pétitionnaire indique que cette surveillance générale doit être proportionnée aux risques encourus compte tenu de l'importance des importations et des usages qui en seront faits dans les Etats membres. Cet usage étant de même nature que pour le coton conventionnel, il convient d'appliquer les mêmes procédures de surveillance en termes de manipulations et de transformation en prenant en compte l'expérience et le savoir-faire acquis en la matière.

4.1. Plan de surveillance spécifique

En l'absence d'identification de risque pour la sécurité en matière de santé humaine et animale ou pour l'environnement, le HCB considère, comme le pétitionnaire, qu'il n'y a pas lieu de mettre en place une surveillance spécifique.

4.2. Plan de surveillance générale

- Le temps de surveillance :

La période de surveillance proposée par le pétitionnaire couvre la période d'autorisation.

Le CS du HCB demande cependant que le suivi soit prolongé au-delà de la durée de l'autorisation pour permettre l'écoulement du stock de graines en circulation dans la filière afin d'éviter d'éventuelles repousses dans les DROM-COM en particulier.

- Obligations du pétitionnaire :

Le pétitionnaire s'engage en accord avec la réglementation en vigueur à :

- mettre en place une surveillance reposant sur des réseaux de surveillance afin de collecter des données pertinentes sur la surveillance du coton GHB119 ;
- s'assurer que les informations relatives à cette surveillance lui soient communiquées de manière à ce qu'elles figurent dans le rapport annuel.

Les tierces personnes impliquées dans cette surveillance générale ont l'obligation de signaler tout effet adverse au pétitionnaire qui enquêtera sans délai et informera la Commission européenne.

- Systèmes de surveillance :

Comme le pétitionnaire n'est pas impliqué dans le commerce du coton, il se rapprochera pour cette surveillance de réseaux d'opérateurs spécialisés dans l'importation, la manipulation et le transport du coton qui est du matériel viable. Ces réseaux sont les plus à même de signaler de potentiels événements dommageables à partir de la surveillance de routine qu'ils effectuent. Le pétitionnaire indique qu'il se référera à l'expertise de l'association Europabio (Association européenne des bioindustries) qui regroupe les industriels des industries des biotechnologies.

Europabio travaille avec :

- des réseaux d'importation et de commercialisation : COCERAL est l'organisme professionnel (distributeurs, grossistes, importateurs, exportateurs) traitant des céréales, du riz, des oléagineux, des huiles et matières grasses, aliments pour bétail ;
- les gestionnaires des silos (stockage) : UNISTOCK regroupe les professionnels de 12 pays européens et appartient lui-même au réseau COCERAL ;
- les huileries : FEDIOL est la fédération d'industriels produisant les huiles et les tourteaux protéiques à usage alimentaire. Elle rassemble 85% des producteurs européens traitant plus de 150 produits à base d'huiles végétales et de matières grasses.

Ces trois réseaux ont été sélectionnés en raison de leur expérience dans le secteur de l'importation de produits alimentaires protéagineux contenant du matériel génétique susceptible d'une reproduction. C'est pourquoi ils ont été retenus préférentiellement à d'autres réseaux qui manipulent des produits non viables. Par ailleurs, ces trois réseaux ont une connaissance du contexte européen, en particulier des règles d'étiquetage ainsi que des exigences de traçabilité en accord avec le règlement (EC) No 1830/2003, ce qui leur permet de noter l'apparition d'anomalies et de les signaler. Ils sont donc en mesure de réaliser une surveillance ciblée.

- Méthodologie de la surveillance :

Le pétitionnaire indique que la surveillance générale s'appuie sur un suivi HACCP (*Hazard Analysis of Critical Control Point* ou Analyse pour le contrôle des points critiques dangereux). L'HACCP identifie, évalue et maîtrise les dangers significatifs au regard de la sécurité des aliments. C'est une méthode, un outil de travail pour une analyse des dangers et la détermination des points critiques pour leur maîtrise, mais ce n'est pas une norme.

La méthodologie de la surveillance est sous la responsabilité de l'association Europabio (Association européenne des industries biotechnologies), qui sera chargée :

- d'agrèer le choix des opérateurs et de faire une information auprès d'eux sur la conduite de la surveillance générale relative du coton GHB119 ;
- de réaliser un site web interactif qui, outre un rôle informatif, devra être interactif (pour noter les éventuelles anomalies) ;
- de vérifier la pertinence des résultats obtenus les années précédentes et de faire évoluer le cas échéant le choix des méthodologies, indicateurs et points critiques retenus (ISO, HACCP) ;
- de faire un travail d'information auprès des réseaux de surveillance sur les résultats obtenus l'année précédente et de rapporter tout incident ou effet adverse constaté ;

- de rendre un rapport annuel aux autorités compétentes et de signaler sans délai un effet néfaste qui serait apparu.

En conséquence, les sociétés des réseaux COCERAL, UNISTOCK et FEDIOL notifieront à Europabio les résultats de la surveillance sur une base annuelle. Ils avertiront sans délai Europabio de la survenue d'un événement anormal, celui-ci en informera le pétitionnaire qui à son tour informera la Commission européenne immédiatement.

- Rapport sur la surveillance et ajustements :

En accord avec le règlement (EC) No 1829/2003, le pétitionnaire informera la Commission européenne des résultats de la surveillance générale au moyen d'un rapport annuel.

En cas d'apparition d'effets non intentionnels non prévisibles, le pétitionnaire et les autorités compétentes examineront ensemble les mesures à prendre s'il est nécessaire de protéger la santé humaine et animale et l'environnement, ceci dans le respect de la proportionnalité de la réponse à l'anomalie repérée.

Le pétitionnaire propose que des réajustements de méthodologies et des mises à jour dans la surveillance soient accomplis autant que de nécessaire.

Le plan de surveillance générale proposé par le pétitionnaire indiquant l'organisation du suivi de la surveillance et de la démarche méthodologique qui sera observée, est jugé satisfaisant.

5. Coexistence des filières

L'identifiant unique communautaire BCS-GH005-8 a été attribué au coton GHB119 conformément au Règlement (CE) 65/2004.

La méthode de détection / identification / quantification proposée par les pétitionnaires est basée sur le fragment de bordure en 3' de l'insert et a été validée lors d'un test inter-laboratoires en 2012 par le CRL-GMFF (EURL-GMFF)¹⁸ et le réseau ENGL. La méthode satisfait aux critères de performance ENGL et EURL-GMFF, en accord avec les règlements 641/2004 et 619/2011 (EURL-GMFF, 2011).

En pratique la quantification du coton OGM pourra souffrir du manque de spécificité du gène de référence proposé (*adhC*) présent dans le génome (A et D) de plusieurs espèces de *Gossypium*. En effet (i) l'étude de spécificité rapportée (document 8_Annex4 – Validation) ne porte que sur de possibles réactions croisées avec le soja, le riz, le colza et le maïs et ne satisfait donc pas aux critères de spécificité recommandés par ENGL¹⁹ (voir <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/guidancedocs.htm>) et la norme ISO DIS 21570 (2008) et (ii) l'effet des recombinaisons généralement observées dans l'amplification de séquences partiellement homologues n'a pas été estimé. Aucune recommandation quant aux précautions à prendre n'a par ailleurs été fournie (Cronn et al., 2002; Lahr and Katz, 2009). Il est probable que ce gène de référence soit également amplifiable dans d'autres genres proches comme *Gossypoides kirkii*.

Les mêmes remarques s'appliquent aux probables limites des méthodes de quantification des cotons GM GHB614 et LL25 utilisant le même gène de référence.

¹⁸ Community Reference Laboratory for GM Food and Feed of the Joint Research Centre, Laboratoire de référence communautaire du Centre de recherche commun de la Commission Européenne, instauré par le règlement (CE) 1829/2003, appelé maintenant l'EURL-GMFF (European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed) : http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-gmff.

¹⁹ European Network of GMO Laboratories

Un tel problème avait déjà été relevé dans le cas des gènes de référence *sah7* et *acp1* utilisés pour la quantification relative d'autres cotons GM.

Du matériel de référence certifié, issu de semences, est disponible auprès de l'IRMM²⁰ (ERM-BF428a-c).

Les éléments nécessaires à la traçabilité ne sont donc pas disponibles, la quantification peut être faussée par la présence d'autres organismes en raison de l'absence de spécificité démontrée du gène de référence *adhC*. Des contaminations de semences ont déjà été observées en Grèce (560 ha et 1000 tonnes détruites) et en Australie.

Il devrait enfin être demandé au pétitionnaire de mettre à jour sa littérature et de ne plus utiliser l'antique référence (Arumuganathan and Earle, 1991) et de calibrer dorénavant ses résultats de quantification avec la référence (Praça-Fontes et al., 2011).

En conclusion le pétitionnaire devrait fournir une autre méthode de quantification relative de coton GM spécifique de *G. hirsutum*.

5.1. Coexistence

En raison de l'absence de cultures de coton non transgéniques en France métropolitaine l'importation de graines de coton GHB119 ne devrait pas poser de problème de coexistence.

Les conditions de coexistence dans certains DROM-COM seraient à envisager différemment du fait d'un climat plus favorable aux repousses de coton et à la présence potentielle de cultures de cotonnier non transgéniques. Dans l'éventualité où un échappement fortuit de graines aux alentours des voies d'importation produirait des repousses de cotonnier GHB119 à proximité de cultures de cottonniers non transgéniques, serait possible une contamination de semences par pollinisation ou en un mélange de graines à la récolte.

Toutefois, la probabilité de tels événements est faible compte tenu de la nécessité :

- d'une étroite proximité entre les zones de culture de cottonniers et les voies d'importation,
- de la faible probabilité de telles repousses, considérant la rareté des conditions requises,
- de la faible probabilité de synchronisation avec les cultures de cottonniers pour conduire à un mélange de graines,

elle-même combinée à la probabilité encore plus faible d'une contamination par pollinisation compte tenu des arguments déjà apportés précédemment.

6. Conclusions

Au terme de l'analyse de l'ensemble des données fournies par le pétitionnaire et de données supplémentaires disponibles dans la littérature scientifique, le CS du HCB retient les points suivants :

- la probabilité d'installation d'une population férale en France métropolitaine à partir d'échappements de graines viables est considérée comme très faible. Le risque de contamination pollinique est par ailleurs nul compte tenu de l'absence de culture de cotonnier en France métropolitaine ;

²⁰ Institute for Reference Materials and Measurements : l'un des sept instituts du laboratoire de référence communautaire, <http://irmm.jrc.ec.europa.eu/html/homepage.htm>.

- la possibilité d'installation d'une population férale dans les DROM-COM à partir d'échappements de graines viables bien que peu probable devrait cependant être prise en compte. Le risque subséquent de contamination pollinique de culture de cotonnier resterait très faible ;

Le plan de surveillance proposé par le pétitionnaire est satisfaisant.

Le CS du HCB recommande que, si elle était autorisée, la mise sur le marché du cotonnier GHB119 soit accompagnée de mesures propres à répondre au risque lié à sa possibilité de persistance dans certains DROM-COM.

7. Bibliographie

Arnaut, G., Boets, A., Vannest, S., Van Rie, J., and Van Houdt, S. (2002). Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins.

Arumuganathan, K., and Earle, E.D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Report.* 9, 208–218.

Australian Government, OGTR (2008). The biology of *Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium barbadense* L. (cotton). (Australian Government - Department of Health and Ageing - Office of the Gene Technology Regulator).

Barrow, J.R. (1981). A new concept in assessing cotton pollen germinability. *Crop Sci.* 21, 441–443.

Barrow, J.R. (1983). Comparisons among pollen viability measurement methods in cotton. *Crop Sci.* 23, 734–736.

Brown, M.S. (1947). A case of spontaneous reduction of chromosome number in somatic tissue of cotton. *Am. J. Bot.* 34, 384–388.

Caccia, S., Hernández-Rodríguez, C.S., Mahon, R.J., Downes, S., James, W., Bautsoens, N., Van Rie, J., and Ferré, J. (2010). Binding site alteration is responsible for field-isolated resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins in two *Helicoverpa* species. *PLoS One* 5, e9975.

Cronn, R., Cedroni, M., Haselkorn, T., Grover, C., and Wendel, J.F. (2002). PCR-mediated recombination in amplification products derived from polyploid cotton. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* 104, 482–489.

Dankocsik, C., Donovan, W.P., and Jany, C.S. (1990). Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. *Mol. Microbiol.* 4, 2087–2094.

Demanèche, S., Sanguin, H., Pote, J., Navarro, E., Bernillon, D., Mavingui, P., Wildi, W., Vogel, T.M., and Simonet, P. (2008). Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3957–3962.

EC (2001). Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. *Off. J. Eur. Communities* L106, 1–36.

EC (2003a). Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. *Off. J. Eur. Union L268*, 1–23.

EC (2003b). Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. *Off. J. Eur. Union L268*, 24–28.

EFSA (2006). Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. *EFSA J.* 99, 1–100.

EFSA (2009). Scientific opinion on Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs, on request of EFSA. *EFSA J.* 1250, 1–62.

English, L., Robbins, H., Vontersch, M., Kulesza, C., Ave, D., Coyle, D., Jany, C., and Slatin, S. (1994). Mode of action of CryIIA: a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 1025–1035.

EURL-GMFF (2011). Technical guidance document from the European Union Reference Laboratory for genetically modified food and feed on the implementation of Commission regulation (EC) No 619/2011. JRC-IHCP Ed Ispra Italy Jt. Res. Cent. pp. 6.

van Frankenhuyzen, K. (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 1–16.

Free (1993). *Insect Pollination of Crops*. (Academic Press; London, UK),.

Gebhard, F., and Smalla, K. (1998). Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1550–1554.

Gouffon, C., Van Vliet, A., Van Rie, J., Jansens, S., and Jurat-Fuentes, J.L. (2011). Binding sites for *Bacillus thuringiensis* Cry2Ae toxin on heliothine brush border membrane vesicles are not shared with Cry1A, Cry1F, or Vip3A toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3182–3188.

Govila, O.P., and Rao, C.H. (1969). Studies on the in vitro germination and storage of cotton pollen. *J. Palynol.* 5, 37–41.

Han, S.M., Oh, T.K., Uddin, M.R., Shinogi, Y., Lee, B., Kim, C.G., and Park, K.W. (2015). Monitoring the occurrence of genetically modified maize in Korea: A 3-year observations. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 285–290.

Hernández-Rodríguez, C.S., Van Vliet, A., Bautsoens, N., Van Rie, J., and Ferré, J. (2008). Specific binding of *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins to a common site in the midgut of *Helicoverpa* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7654–7659.

Hernández-Rodríguez, C.S., Hernández-Martínez, P., Van Rie, J., Escriche, B., and Ferré, J. (2013). Shared midgut binding sites for Cry1A.105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins from *Bacillus*

thuringiensis in two important corn pests, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. *PLoS One* 8, e68164.

Jennings, J.C., Albee, L.D., Kolwyck, D.C., Surber, J.B., Taylor, M.L., Hartnell, G.F., Lirette, R.P., and Glenn, K.C. (2003a). Attempts to detect transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein in muscle from broilers fed YieldGard Corn Borer Corn. *Poult. Sci.* 82, 371–380.

Jennings, J.C., Kolwyck, D.C., Kays, S.B., Whetsell, A.J., Surber, J.B., Cromwell, G.L., Lirette, R.P., and Glenn, K.C. (2003b). Determining whether transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein are detectable in muscle from swine fed Roundup Ready soybean meal. *J. Anim. Sci.* 81, 1447–1455.

Kakani, V.G., Reddy, K.R., Koti, S., Wallace, T.P., Prasad, P.V.V., Reddy, V.R., and Zhao, D. (2005). Differences in in vitro pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperature. *Ann. Bot.* 96, 59–67.

Kareiva, P., Morris, W., and Jacobi, C.M. (1994). Studying and managing the risk of cross-fertilization between transgenic crops and wild relatives. *Mol. Ecol.* 3, 15–21.

Kay, E., Vogel, T.M., Bertolla, F., Nalin, R., and Simonet, P. (2002). In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3345–3351.

Lahr, D.J.G., and Katz, L.A. (2009). Reducing the impact of PCR-mediated recombination in molecular evolution and environmental studies using a new-generation high-fidelity DNA polymerase. *BioTechniques* 47, 857–866.

de Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., and Schnepf, H.E. (2003). Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet* 37, 409–433.

McDowell, A.J., Bange, M.P., and Tan, D.K.Y. (2007). Cold temperature exposure at 10°C for 10 and 20 nights does not reduce tissue viability in vegetative and early flowering cotton plants. *Aust. J. Exp. Agric.* 47, 198.

Mehetre, S.S., Thombre, M.V., and Tyyab, M.A. (1980). Cytomorphological studies in an intergeneric hybrid between *Gossypium hirsutum* L. (2n=52) and *Hibiscus panduriformis* Burm. *Euphytica* 29, 323–330.

Morse, R.J., Yamamoto, T., and Stroud, R.M. (2001). Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Struct. Lond. Engl.* 1993 9, 409–417.

Nemeth, A., Wurz, A., Artim, L., Charlton, S., Dana, G., Glenn, K., Hunst, P., Jennings, J., Shilito, R., and Song, P. (2004). Sensitive PCR analysis of animal tissue samples for fragments of endogenous and transgenic plant DNA. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6129–6135.

- Netherwood, T., Martín-Orúe, S.M., O'Donnell, A.G., Gockling, S., Graham, J., Mathers, J.C., and Gilbert, H.J. (2004). Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nat. Biotechnol.* 22, 204–209.
- Park, K.W., Lee, B., Kim, C.-G., Kim, D.Y., Park, J.-Y., Ko, E.-M., Jeong, S.-C., Choi, K.-H., Yoon, W.K., and Kim, H.M. (2010). Monitoring the occurrence of genetically modified maize at a grain receiving port and along transportation routes in the Republic of Korea. *Food Control* 21, 456–461.
- Pontiroli, A., Rizzi, A., Simonet, P., Daffonchio, D., Vogel, T.M., and Monier, J.M. (2009). Visual evidence of horizontal gene transfer between plants and bacteria in the phytosphere of transplastomic tobacco. *Appl Env. Microbiol* 75, 3314–3322.
- Praça-Fontes, M.M., Carvalho, C.R., Clarindo, W.R., and Cruz, C.D. (2011). Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards.” *Plant Cell Rep.* 30, 1183–1191.
- Rikin, A., Atsmon, D., and Gitler, C. (1979). Chilling injury in cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Prevention by abscisic acid. *Plant Cell Physiol* 20, 1537–1546.
- Rizzi, A., Pontiroli, A., Brusetti, L., Borin, S., Sorlini, C., Abruzzese, A., Sacchi, G.A., Vogel, T.M., Simonet, P., Bazzicalupo, M., et al. (2008). Strategy for in situ detection of natural transformation-based horizontal gene transfer events. *Appl Env. Microbiol* 74, 1250–1254.
- Sharma, R., Damgaard, D., Alexander, T.W., Dugan, M.E.R., Aalhus, J.L., Stanford, K., and McAllister, T.A. (2006). Detection of transgenic and endogenous plant DNA in digesta and tissues of sheep and pigs fed Roundup Ready canola meal. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1699–1709.
- Singh, A.K., and Dubey, S.K. (2015). Current trends in Bt crops and their fate on associated microbial community dynamics: a review. *Protoplasma*.
- Soberon, M., Gill, S.S., and Bravo, A. (2009). Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cell Mol Life Sci* 66, 1337–1349.
- Stewart, J.M. (1992). Gene transfer between contiguous cultivated cotton and between cultivated and wild relatives.
- Thies, S.A. (1953). Agents Concerned with Natural Crossing of Cotton in Oklahoma¹. *Agron. J.* 45, 481.
- Vaissière, B.E., and Vinson, S.B. (1994). Pollen morphology and its effect on pollen collection by honey-bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), with special reference to upland cotton, *Gossypium hirsutum* L. (Malvaceae). *Grana* 33, 128–138.
- Van Deynze, A.E., Sundstrom, F.J., and Bradford, K.J. (2005). Pollen-mediated gene flow in California cotton depends on pollinator activity. *Crop Sci.* 45, 1565–1570.
- Zhu, Y., Li, D., Wang, F., Yin, J., and Jin, H. (2004). Nutritional assessment and fate of DNA of soybean meal from roundup ready or conventional soybeans using rats. *Arch. Anim. Nutr.* 58, 295–310.

Annexe 1 : Saisine



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT

**Direction générale de
l'alimentation**

Service des actions
sanitaires en production
primaire

Sous direction de la
qualité, de la santé et de
la protection des
végétaux

Bureau des semences et
de la protection intégrée
des cultures

251, rue de Vaugirard
75732 Paris cedex 15

Madame Christine NOIVILLE
Présidente du Haut conseil des
biotechnologies
à l'attention de Madame Joëlle BUSUTTIL
244, boulevard Saint-Germain
75007 PARIS

5 NOV. 2015

Paris, le

Objet : saisine du Haut conseil des biotechnologies sur un dossier de demande de mise sur le marché d'OGM

Références : saisine HCB – dossier NL-2011-96

Affaire suivie par : Anne Grevet

tél : 01 49 55 58 25 fax : 01 49 55 59 49

courriel : anne.grevet@agriculture.gouv.fr

Madame la Présidente,

Dans le cadre du règlement 1829/2003 relatif aux denrées alimentaires et aliments pour animaux génétiquement modifiés, l'évaluation des dossiers de demande de mise sur le marché est confiée à l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA). Pendant cette période d'évaluation, l'AESA consulte les États membres sur les dossiers. Lorsque l'AESA a rendu un avis, la Commission européenne propose au vote des États membres un projet de décision.

Le dossier suivant est susceptible de faire prochainement l'objet d'un avis de l'AESA, qui sera suivi d'un vote des États membres sur un projet de décision :

- dossier EFSA-GMO-NL-2011-96, concernant la mise sur le marché du coton génétiquement modifié GHB119 pour l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale.

Dans la perspective d'un vote des États membres sur ce dossier, j'ai l'honneur de vous demander, par la présente saisine, de bien vouloir procéder à une évaluation de ce dossier afin de rendre un avis au plus tard le 18 janvier 2016.

Je vous prie de croire, Madame la Présidente, à l'assurance de ma considération distinguée.

Le sous-directeur de la qualité
et de la protection des végétaux

Alain TRIDON

Annexe 2 : Elaboration de l'avis

Cet avis a été élaboré par le CS du HCB à partir de la discussion de rapports d'expertise et d'un projet d'avis en séance du 16 décembre 2015²¹ sous la présidence du Dr Jean-Christophe Pagès et la vice-présidence du Dr Pascal Boireau et du Dr Claudine Franche.

Le CS du HCB est un comité pluridisciplinaire composé de personnalités scientifiques nommées par décret au titre de leur spécialité en relation avec les missions du HCB. Par ordre alphabétique des noms de famille, le CS du HCB est composé de :

Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Philippe Berny, Yves Bertheau, Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno Chauvel, Denis Couvet, Elie Dassa, Hubert De Verneuil, Nathalie Eychenne, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, André Jestin, Bernard Klonjowski, Marc Lavielle, Valérie Le Corre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Eliane Meurs, Nadia Naffakh, Didier Nègre, Jean-Louis Noyer, Sergio Ochatt, Jean-Christophe Pagès, Daniel Parzy, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte²².

Le dossier a été examiné par six experts rapporteurs sélectionnés parmi les membres du CS du HCB pour leurs compétences dans les disciplines requises pour l'analyse du dossier.

Les membres du CS du HCB remplissent annuellement une déclaration publique d'intérêts. Ils sont également interrogés sur l'existence d'éventuels conflits d'intérêts avant l'examen de chaque dossier. Ayant participé à l'élaboration de l'avis de l'EFSA en tant que membre du panel OGM de l'EFSA, Philippe Guerche n'a contribué ni à l'analyse de ce dossier, ni à l'élaboration de cet avis. Aucun membre du CS n'a déclaré avoir de conflits d'intérêts qui auraient pu interférer avec l'élaboration de cet avis.

²¹ Membres du CS présents et représentés lors de la discussion du projet d'avis en séance du 16 décembre 2015 : Marie-Anne Barny, Yves Bertheau, Pascal Boireau, Bruno Chauvel, Hubert De Verneuil, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, André Jestin, Bernard Klonjowski, Valérie Le Corre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Didier Nègre, Jean-Christophe Pagès, Michel Renard, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.

²² Composition du CS en vigueur suite au décret de nomination des membres du HCB du 30 décembre 2014 et à la loi du 2 décembre 2015.