

HAUT CONSEIL DES BIOTECHNOLOGIES

COMITE SCIENTIFIQUE

Paris, le 12 juillet 2010

AVIS

en réponse à la saisine¹ **100301-saisine HCB-dossier pomme de terre culture** relative au dossier **C/SE/96/3501**.

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 11 mars 2010 par les autorités compétentes françaises (la Direction générale de l'alimentation du Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche) d'une demande d'analyse du dossier C/SE/96/3501, relatif à la mise sur le marché de la pomme de terre génétiquement modifiée EH92-527-1 pour la culture et la transformation industrielle, et de l'avis de l'AESA correspondant, notamment en ce qui concerne le gène de résistance à un antibiotique et les possibilités de transfert de gènes vers l'environnement. Le dossier EFSA/GMO/UK/2005/14, relatif à l'utilisation en alimentation animale de la pomme de terre EH92-527-1, sera pris en compte dans ces analyses. Il est également demandé au HCB de proposer les conditions techniques qui pourraient être mises en œuvre dans le cadre de la coexistence avec des cultures de pomme de terre conventionnelle.

Les dossiers **C/SE/96/3501** et **EFSA/GMO/UK/2005/14** sont déposés par la société BASF Plant Science dans le cadre respectivement de la directive 2001/18/CE et du règlement (CE) 1829/2003. La présente saisine du HCB est référencée **100301-saisine HCB-dossier pomme de terre culture**.

Le Comité scientifique (CS)² du HCB a procédé à l'examen du dossier le 12 mai 2010 sous la présidence de Jean-Christophe Pagès.

¹ La saisine « **100301-saisine HCB-dossier pomme de terre culture** » est reproduite dans l'Annexe 1.

² La composition du CS ainsi que les rapporteurs externes ayant contribué à l'élaboration de l'avis sont indiqués dans l'Annexe 2.

RESUME DE L'AVIS³

La saisine reçue par le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) porte sur l'évaluation des risques environnementaux et sanitaires associés à la culture de la lignée de pomme de terre génétiquement modifiée EH92-527-1, notamment en relation avec la présence du gène *nptII* de résistance à des antibiotiques⁴. Il est également demandé au HCB de proposer des conditions techniques qui pourraient être mises en œuvre dans le cadre de la coexistence avec des cultures de pomme de terre conventionnelle.

Description du produit

Le clone de pomme de terre EH92-527-1, obtenu à partir de la transformation par *Agrobacterium tumefaciens* de la variété féculière tétraploïde Prevalent, contient deux cassettes d'expression transgénique : l'une induisant la diminution de la teneur en amylose de l'amidon du tubercule par modification de l'expression d'une enzyme, la *Granule Bound Starch Synthetase*, et l'autre conférant une résistance à certains antibiotiques de la famille des aminoglycosides par l'expression du gène *nptII*, gène qui a servi de marqueur pour la sélection initiale de la plante génétiquement modifiée.

L'amidon de la pomme de terre EH92-527-1 est appauvri en amylose (2% au lieu de 15%) et enrichi en amylopectine (98% au lieu de 85%) par rapport à la variété équivalente non transgénique Prevalent.

L'insertion de l'ADN-T est complexe, mais bien caractérisée au niveau moléculaire. Elle est localisée en un site unique dans l'un des chromosomes 5 de la pomme de terre, et n'interrompt pas de gène endogène. Les séquences transgéniques et les phénotypes qu'elles induisent sont stables au cours des générations de propagation clonale.

Impact sur la santé humaine et animale

Aucun effet négatif sur la santé humaine et animale n'a été détecté dans les études de toxicité et d'allergénicité de la protéine NPTII isolée, ni dans les études de toxicité, d'allergénicité et d'alimentarité de la pomme de terre entière EH92-527-1 ou d'un produit dérivé (pulpe). Toutefois, ces études ne comportent pas de données sur la puissance des tests mis en œuvre, si bien qu'il est impossible d'évaluer le risque qu'un effet biologiquement significatif ne soit pas détecté avec les protocoles adoptés.

Le transfert horizontal de la résistance aux antibiotiques conférée par *nptII* de la pomme de terre EH92-527-1 vers des bactéries pathogènes pour l'homme ou l'animal, bactéries dont le traitement nécessiterait l'usage d'antibiotiques contre lesquels *nptII* confère une résistance (essentiellement des mycobactéries multirésistantes et les bactéries responsables d'infections oculaires superficielles chez l'homme), est très improbable. Le gène *nptII*, ainsi que d'autres déterminants génétiques de cette résistance aux antibiotiques, sont naturellement présents en abondance dans les bactéries commensales du tube digestif de l'homme et des animaux. Le transfert de la résistance conférée par *nptII* de ces bactéries commensales vers les bactéries pathogènes de l'homme ou l'animal est bien plus probable qu'un transfert à partir de la pomme de terre EH92-527-1. Le transgène *nptII* de la pomme de terre EH92-527-1 ne présente donc pas de risque singulier pour la santé humaine et animale.

Impact sur l'environnement et risque de dissémination

La pomme de terre se multiplie principalement par voie végétative. La pomme de terre n'est pas une espèce invasive et survit rarement hors des parcelles cultivées. La modification

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

⁴ L'article 4 de la directive 2001/18/CE et sa transposition dans l'article 19 de la loi du 25 juin 2008, (Articles L. 533-3 et L.533-5 du Code de l'environnement) stipulent qu'aucun organisme génétiquement modifié ne sera autorisé au-delà du 1^{er} janvier 2009 s'il contient des gènes de résistance aux antibiotiques dont l'évaluation des risques conclut qu'ils sont susceptibles d'avoir des effets préjudiciables sur l'environnement ou la santé publique. Le CS du HCB procède donc à l'évaluation des risques potentiellement associés au gène de résistance aux antibiotiques *nptII*.

génétique EH92-527-1 ne confère pas d'avantage sélectif à la pomme de terre susceptible d'augmenter la probabilité de son maintien dans l'environnement.

La pomme de terre n'est pas interféconde avec d'autres espèces de solanacées en Europe.

La pollinisation de plants de pomme de terre de parcelles voisines ou l'éventualité de repousses ultérieures ne présentent pas de risque particulier pour l'environnement, mais doivent être considérées dans le cadre de la coexistence entre cultures de pomme de terre transgénique et non transgénique.

Le transfert horizontal du transgène *npII* de la pomme de terre EH92-527-1 à des bactéries de l'environnement est théoriquement possible, mais n'a jamais été détecté en champ. L'impact sur l'environnement d'un tel transfert serait vraisemblablement nul, le transgène étant construit pour ne s'exprimer que chez des eucaryotes. Si le transgène acquérait la capacité de s'exprimer chez les bactéries réceptrices, son impact serait négligeable sur les populations bactériennes de l'environnement, les déterminants génétiques de la résistance à la kanamycine étant déjà abondants dans la flore bactérienne tellurique.

Mesures propres à assurer la coexistence des filières

Le pétitionnaire prévoit un système de préservation d'identité (*Identity Preservation system*, système contractuel entre le producteur de semences, le cultivateur et la féculerie) qui favorise une séparation globale des filières. En complément à ce système, le CS du HCB proposera aux autorités compétentes des mesures propres à permettre la coexistence entre les cultures de pommes de terre EH92-527-1 et les cultures de pommes de terre non transgéniques au champ. Cette proposition sera élaborée après définition des modalités de la coexistence par le HCB à la suite de la publication du décret définissant les seuils de tolérance de présence d'ADN transgénique dans les produits dits « sans OGM ».

Au vu des données disponibles, le CS peut d'ores et déjà indiquer les points suivants. Le risque de pollinisation de plants de pomme de terre de parcelles voisines est limité (pollen peu abondant, peu fertile, disséminé que sur de courtes distances) et pourrait être contrôlé par des mesures appropriées (distances inter-parcellaires, contrôle des insectes des parcelles transgéniques si nécessaire). Les repousses à partir de baies ou de tubercules peuvent être éliminées par des pratiques culturales de travail du sol ou d'utilisation d'herbicides, et leur absence des filières non transgéniques peut être favorisée par des rotations d'une durée adaptée. Conformément au règlement (CE) 1829/2003, des méthodes d'identification et de quantification de la pomme de terre EH92-527-1 ont été fournies par le pétitionnaire. La méthode de quantification devra être améliorée pour répondre aux critères de validation ENGL^{5,6}.

Plans de surveillance post-commercialisation

En cas de mise en culture de pomme de terre EH92-527-1, le CS du HCB recommande la mise en place d'un plan de surveillance post-commercialisation générale.

Le plan de surveillance générale est destiné à mettre en évidence les effets inattendus sur l'environnement et la santé animale ou humaine. Les mesures proposées par le pétitionnaire ne concernent que la surveillance de l'environnement. Il est cependant souhaitable que les animaux qui seront nourris avec les pulpes de pomme de terre issues de la transformation industrielle fassent également l'objet d'un plan de surveillance générale de leur santé.

Aucun risque n'ayant été identifié par le pétitionnaire, aucun plan de surveillance spécifique n'est prévu en dehors des pratiques culturales habituelles et des questionnaires liés au système de ségrégation des filières.

⁵ ENGL (*European Network of GMO Laboratories*), réseau européen de laboratoires OGM dont l'objectif est d'améliorer la traçabilité des OGMs dans l'alimentation et la réglementation de leur utilisation en Europe. Le réseau développe et valide des méthodes pour la détection et la quantification des OGMs dans l'alimentation.

⁶ Les critères de validation ENGL sont disponibles sur le site du laboratoire de référence communautaire : <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/guidancedocs.htm>.

En conclusion

Au terme de l'analyse du dossier du pétitionnaire, de l'avis de l'AESA et de données supplémentaires disponibles dans la littérature scientifique, le CS du HCB note que :

- bien que son transfert vers des bactéries soit théoriquement possible, la présence du transgène *nptII* dans la pomme de terre EH92-527-1 ne présente pas de risque singulier pour l'environnement et la santé ;
- aucun effet négatif sur la santé humaine et animale n'a été détecté lors des études de toxicité et d'allergénicité de la protéine NPTII isolée, ni lors des études de toxicité, d'allergénicité et d'alimentarité de la pomme de terre entière EH92-527-1 ou d'un produit dérivé (pulpe). Toutefois, ces études ne comportent pas de données sur la puissance des tests mis en œuvre, si bien qu'il est impossible d'évaluer le risque qu'un effet biologiquement significatif ne soit pas détecté avec les protocoles adoptés. Ces informations seront exigées à l'avenir, conformément aux nouvelles lignes directrices sur l'analyse statistique de l'AESA (EFSA, 2009b).

Le CS recommande que la culture de pomme de terre EH92-527-1 soit accompagnée de mesures propres à :

- assurer la coexistence entre les filières transgéniques et non transgéniques selon les recommandations qui seront proposées ultérieurement par le HCB ;
- améliorer les plans de surveillance proposés par le pétitionnaire en implémentant les recommandations de l'association Europabio.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	6
2. CARACTERISTIQUES DES PLANTES GENETIQUEMENT MODIFIEES.....	7
2.1 DESCRIPTION DU PRODUIT.....	7
2.2 CARACTERISTIQUES DE LA CONSTRUCTION GENETIQUE.....	8
2.3 METHODE DE TRANSFORMATION	9
2.4 CARACTERISTIQUES DE LA POMME DE TERRE EH92-527-1	9
3. EVALUATION DE L'IMPACT SUR LA SANTE HUMAINE ET ANIMALE.....	11
3.1 EVALUATION DES RISQUES SANITAIRES ASSOCIES AU GENE NPTII	12
3.2 SECURITE DE L'ALIMENT EN L'ETAT.....	14
3.3 ALLERGENICITE.....	15
3.4 ALIMENTARITE CHEZ UNE ESPECE CIBLE.....	15
3.5 CONSIDERATIONS STATISTIQUES.....	15
4. EVALUATION DES RISQUES POUR L'ENVIRONNEMENT	16
4.1 DISSEMINATION POTENTIELLE PAR LE POLLEN ET LES GRAINES	16
4.2 DISSEMINATION POTENTIELLE PAR VOIE VEGETATIVE.....	18
4.3 DISSEMINATION POTENTIELLE VERS LES BACTERIES DU SOL (TRANSFERT DE GENE HORIZONTAL).....	19
5. MESURES PROPRES A ASSURER LA COEXISTENCE DES FILIERES.....	21
5.1 TRAÇABILITE DE LA FILIERE EH92-527-1.....	21
5.2 SYSTEME DE SEGREGATION.....	21
5.3 MESURES DE COEXISTENCE AU CHAMP.....	22
6. PLAN DE SURVEILLANCE POST-COMMERCIALISATION	22
6.1 PLAN DE SURVEILLANCE GENERALE.....	23
6.2 PLANS DE SURVEILLANCE SPECIFIQUE	23
6.3 COMMENTAIRES ET RECOMMANDATIONS DU CS.....	23
7. CONCLUSIONS	24
8. BIBLIOGRAPHIE	25
ANNEXE 1 : SAISINE	30
ANNEXE 2 : ELABORATION DE L'AVIS.....	32
ANNEXE 3 : ANALYSE DE L'AVIS DE L'AESA.....	33
ANNEXE 4 : RECOMMANDATIONS EN MATIERE DE BIOSURVEILLANCE.....	37

1. Introduction

La lignée de pomme de terre EH92-527-1⁷, génétiquement modifiée pour l'obtention d'un amidon à teneur accrue en amylopectine, a fait l'objet de deux décisions complémentaires d'autorisation de la Commission européenne le 2 mars 2010 :

- la décision 2010/135/UE (EC, 2010b), adoptée au titre de la directive 2001/18/CE⁸, autorise la culture et l'utilisation industrielle de la pomme de terre EH92-527-1, ainsi que BASF Plant Science l'a notifié dans le dossier de demande d'autorisation C/SE/96/3501.
- la décision 2010/136/UE (EC, 2010a), adoptée au titre du règlement (CE) 1829/2003⁹, autorise l'utilisation des co-produits de cette transformation industrielle pour l'alimentation animale, comme notifié par BASF Plant Science dans le dossier EFSA/GMO/UK/2005/14.

Ces autorisations sont l'aboutissement d'une longue procédure d'évaluation qui a débuté en août 1996, avec le dépôt initial du dossier C/SE/96/3501 par la société BASF Plant Science, anciennement Amylogene HB, auprès des autorités compétentes suédoises au titre de la directive 90/220/CEE. Le dossier a été mis à jour en conformité avec la nouvelle directive 2001/18/CE abrogeant la directive 90/220/CEE, et a été soumis à nouveau à la Suède en janvier 2003. L'avis favorable des autorités compétentes suédoises, transmis à la Commission en avril 2004, a été immédiatement soumis aux Etats membres pour recueillir d'éventuelles objections. Dans ce contexte, l'Afssa¹⁰ et la CGB¹¹ ont été saisies pour avis par les autorités compétentes françaises.

En parallèle, le dossier EFSA/GMO/UK/2005/14 relatif à l'utilisation de pomme de terre EH92-528-1 pour l'alimentation humaine et animale a été déposé auprès du Royaume Uni en avril 2005. L'avis de l'Afssa a été sollicité sur les risques sanitaires potentiellement associés à la consommation de la pomme de terre EH92-527-1.

L'AESA¹², sur la base des dossiers et de l'ensemble des avis des autorités compétentes des Etats membres, dont ceux de la CGB (CGB, 2004, 2005) et de l'Afssa (Afssa, 2004, 2005a, b), a adopté des avis favorables sur les deux dossiers le 7 décembre 2005 (EFSA, 2006b, c).

Les votes respectifs en Conseil des ministres (16 juillet 2007 sur le dossier C/SE/96/3501 ; 18 février 2008 sur le dossier EFSA/GMO/UK/2005/14) n'ayant pas abouti, aucune majorité qualifiée n'ayant été réunie entre les Etats membres, il appartenait alors à la Commission européenne de statuer. Les décisions de la Commission ont été retardées par plusieurs éléments. En particulier, la Commission devait avant tout clarifier la question de l'impact des gènes de résistance aux antibiotiques utilisés comme marqueurs dans certaines plantes génétiquement modifiées. Après un avis prudent de l'EMEA¹³ (EMA, 2007), l'AESA publie un avis concluant sur l'innocuité de ces transgènes dans les plantes génétiquement modifiées (EFSA, 2009a). Basé sur les trois avis favorables de l'AESA, un sur chaque dossier et le troisième sur les gènes de résistance aux antibiotiques, la Commission a finalement décidé d'autoriser la culture de la pomme de terre EH92-527-1 pour la transformation industrielle et l'alimentation animale le 2 mars 2010 (EC, 2010a, b).

⁷ L'expression « pomme de terre EH92-527-1 » utilisée par la suite dans l'avis désigne la lignée de pomme de terre EH92-527-1 telle qu'elle a été sélectionnée à l'origine à partir de l'événement de transformation de la variété Prevalent. Cette lignée est commercialisée sous le nom d'Amflora.

⁸ 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>

⁹ Le règlement (CE)1829/2003 est un règlement du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments, consistant en, ou contenant des, ou issus d'organismes génétiquement modifiés, pour l'alimentation humaine et animale.

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003R1829:FR:HTML>

¹⁰ Agence française de sécurité sanitaire des aliments.

¹¹ Commission du Génie Biomoléculaire.

¹² Autorité européenne de sécurité des aliments, ou EFSA : European Food Safety Authority.

¹³ European Medicines Agency : Agence européenne des médicaments

A la suite de cette décision, les autorités compétentes françaises (la Direction générale de l'alimentation du Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche) saisissent le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) le 11 mars 2010 d'une demande d'analyse du dossier C/SE/96/3501 et de l'avis de l'AESA correspondant¹⁴, notamment en ce qui concerne le gène de résistance à un antibiotique et les possibilités de transfert de gènes vers l'environnement. Il est également demandé au HCB de proposer les conditions techniques qui pourraient être mises en œuvre dans le cadre de la coexistence avec des cultures de pomme de terre conventionnelle.

Dans ce contexte, l'enjeu de l'avis du HCB se situe à deux niveaux, suivant la teneur des résultats de l'analyse du dossier.

- Si l'analyse du HCB met en évidence des éléments scientifiques nouveaux argumentant que la pomme de terre EH92-527-1 présente un risque pour l'environnement ou la santé dans le cadre des usages autorisés par la Commission européenne, le Gouvernement français pourrait décider de limiter ou d'interdire provisoirement sa mise sur le marché ou son utilisation, comme le prévoit la clause de sauvegarde¹⁵ de la directive 2001/18/CE.
- Si l'analyse du HCB ne met pas en évidence d'éléments scientifiques nouveaux argumentant que la pomme de terre EH92-527-1 présente un risque pour l'environnement ou la santé dans le cadre des usages autorisés par la Commission européenne, il s'agit alors de réfléchir aux conditions de mise en culture, notamment aux conditions qui pourraient assurer la coexistence des filières transgéniques et non transgéniques.

2. Caractéristiques des plantes génétiquement modifiées

2.1 Description du produit

La pomme de terre EH92-527-1 contient deux cassettes d'expression transgénique : l'une visant à modifier la composition en amidon du tubercule, et l'autre conférant une résistance à la kanamycine, destinée à servir de marqueur lors de la sélection initiale de la plante génétiquement modifiée.

L'amidon est constitué de deux types de polymères de glucose : l'amylose¹⁶ et l'amylopectine¹⁷. L'amylose est spécifiquement synthétisée par l'enzyme *Granule Bound Starch Synthase* (synthétase granulaire d'amidon ou GBSS). Dans la pomme de terre EH92-527-1, l'expression d'un ARN anti-sens¹⁸ de la séquence codante du gène *gbss* inhibe la synthèse de GBSS, vraisemblablement par un mécanisme de *gene silencing*¹⁹ (Vaucheret, 2006) provoquant la dégradation de l'ARNm du gène *gbss* endogène avant sa traduction en protéine. La réduction importante de la concentration de cette protéine dans les cellules de pomme de terre réduit donc fortement la synthèse d'amylose. La pomme de terre EH92-527-1 contient environ 2% d'amylose et 98% d'amylopectine. Pour comparaison, l'amylose représente normalement de 12 à 25% de l'amidon de pomme de terre. L'amylopectine est une matière première d'intérêt pour l'industrie, pouvant entrer par exemple dans la composition d'épaississant, de papier, d'adhésifs, de textiles, de matériaux de construction biodégradables.

¹⁴ L'analyse de l'avis de l'AESA par le CS du HCB est compilée dans l'Annexe 3 de ce document.

¹⁵ La clause de sauvegarde est une procédure permettant à un Etat membre de limiter ou interdire, à titre provisoire, l'utilisation et/ou la vente d'un OGM sur son territoire, alors que cet OGM a été autorisé au niveau européen (article 23 de la directive 2001/18/CE)

¹⁶ L'amylose est constituée de chaînes linéaires de molécules de D-Glucose, assemblées par des liaisons de type $\alpha(1-4)$

¹⁷ L'amylopectine est constituée de chaînes de $\alpha(1-4)$ D-Glucose ramifiées entre elles par des liaisons $\alpha(1-6)$

¹⁸ Un ARN antisens est une molécule d'ARN, naturelle ou artificielle, qui est complémentaire d'un ARN messenger, et peut en inhiber la fonction.

¹⁹ Inactivation d'un gène, pouvant résulter de différents mécanismes moléculaires d'interférence.

2.2 Caractéristiques de la construction génétique

La construction transgénique à l'origine de l'événement EH92-527-1 était portée par le plasmide binaire pHoxwG, un dérivé du plasmide pBin19. Elle est encadrée des bordures gauche et droite (LB et RB)²⁰ provenant de l'ADN de transfert (ADN-T) du plasmide pTiT37 (*Tumor inducing*) d'*Agrobacterium tumefaciens*. Les bordures visent à définir un nouvel ADN-T, c'est-à-dire la région d'ADN à transférer dans le génome de la plante. L'ADN-T mesure 6637 pb²¹. La construction comprend deux cassettes d'expression.

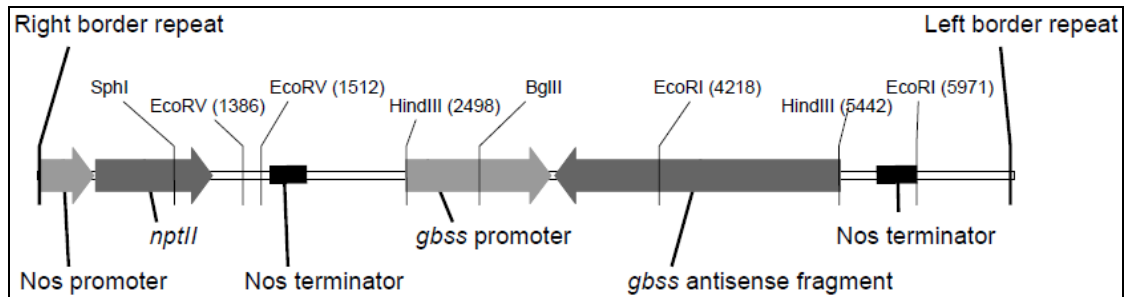


Figure 1. Carte de l'ADN-T du plasmide pHoxwG (Part I Technical Dossier, Dossier EFSA/GMO/UK/2005/14)

La première cassette, de la base n° 1 à la base n° 1824 de l'ADN-T, est constituée :

- du promoteur du gène de la *nopaline synthase* d'*A. tumefaciens* issu du plasmide pTiT37 (*p-nos*, 371 pb). Bien que d'origine bactérienne, ce promoteur a la particularité de ne fonctionner que chez les eucaryotes.²²
- de la séquence du gène *nptII* du transposon Tn5 d'*Escherichia coli*, codant la *néomycine phosphotransférase* II, qui confère une résistance à certains antibiotiques de la famille des aminoglycosides, notamment la kanamycine, la néomycine, la généticine et la paromomycine (784 pb).
- d'une région de polyadénylation du gène de la *nopaline synthase* d'*A. tumefaciens* issue du plasmide pTiT37 (*t-nos*, 255 pb).

L'expression du gène *nptII* dans la plante a pour but de sélectionner les vitroplants portant la construction transgénique.

La deuxième cassette, de la base n° 2497 à la base n° 5978 de l'ADN-T, est constituée :

- du promoteur du gène *gbss* de la *Granule Bound Starch Synthetase* de la pomme de terre (*p-gbss*, 987pb)
- d'un fragment génomique (1943 pb) de la séquence codante du gène *gbss* en orientation « antisens »
- d'une région de polyadénylation du gène de la *nopaline synthase* d'*A. tumefaciens* issu du plasmide pTiT37 (*t-nos*, 276 pb).

L'expression d'un ARN « antisens », complémentaire à une partie de l'ARNm non épissé²³ du gène endogène de la GBSS a pour objectif d'inhiber sa traduction en protéine.

²⁰ LB : *left border* et RB : *right border*

²¹ Pb : Paires de base d'ADN.

²² Le promoteur du gène de la *nopaline synthase* de la bactérie *A. tumefaciens* a la particularité de ne fonctionner que dans un contexte génomique eucaryote. Les souches virulentes d'*A. tumefaciens* induisent des tumeurs dans les plantes par le transfert de leur ADN-T dans le génome des plantes. L'ADN-T est un fragment d'ADN de la bactérie, situé sur le plasmide *Tumor inducing*, contenant des gènes qui seront traduits par la plante une fois qu'ils seront intégrés dans son génome. La *nopaline synthase* est l'un de ces gènes d'origine bactérienne dont le promoteur a évolué pour ne fonctionner qu'une fois intégré dans le génome de la plante.

²³ Les gènes eucaryotes sont transcrits en ARN messagers qui sont rendus fonctionnels par un processus d'épissage, c'est-à-dire d'excision de séquences prédéfinies.

En dehors de l'ADN-T, dans la partie qui n'est pas destinée au transfert dans la plante, le plasmide porte deux origines de répllication bactérienne permettant son amplification d'une part dans *E. coli*, et d'autre part dans *A. tumefaciens*. Le plasmide porte également le gène procaryote *nptIII* conférant la résistance à la kanamycine, permettant de sélectionner les bactéries transformées.

2.3 Méthode de transformation

Le clone de pomme de terre EH92-527-1 a été obtenu après transformation classique *in vitro* de disques foliaires de la variété Prevalent par la souche LBA4404 d'*A. tumefaciens* portant le plasmide pHoxwG. Les bactéries ont été éliminées progressivement de la culture par l'utilisation de l'antibiotique Claforan (Céphalosporine de troisième génération), et les cellules transformées de pomme de terre ont été sélectionnées en présence de kanamycine puis régénérées en plantes entières.

2.4 Caractéristiques de la pomme de terre EH92-527-1

De nombreuses analyses moléculaires de type Southern, amplifications par PCR et séquençages successifs, ainsi que des analyses bioinformatiques, ont permis de caractériser l'événement EH92-527-1, avec des modifications et précisions successives au cours de l'élaboration de ce dossier. Les plus récentes permettent d'établir les points suivants.

- Nombre de sites d'insertion

Une séquence d'ADN transgénique provenant d'un réarrangement de l'ADN-T s'est intégrée en un site d'insertion unique, dans l'un des quatre²⁴ chromosomes 5 de la pomme de terre EH92-527-1. Aucune région du plasmide d'origine (dont le gène procaryote *nptIII*) n'est détectable dans le génome de la pomme de terre EH92-527-1.

- Structure de l'insertion

L'insertion, d'une longueur de 9378 pb, correspond à deux fragments partiels de l'ADN-T d'origine, fusionnés en orientations opposées, la jonction se situant au sein des séquences tronquées de *gbss*. Cette région est constituée d'un premier fragment d'ADN-T dans l'orientation initiale RB-LB, de la base n° 27 à la base n° 5239 sur les 6634 pb de l'ADN-T initial, en fusion avec un autre fragment d'ADN-T dans l'orientation LB-RB de la base n° 4164 à la base n° 27. Les précisions à la base près ont été apportées par le Comité scientifique du HCB.

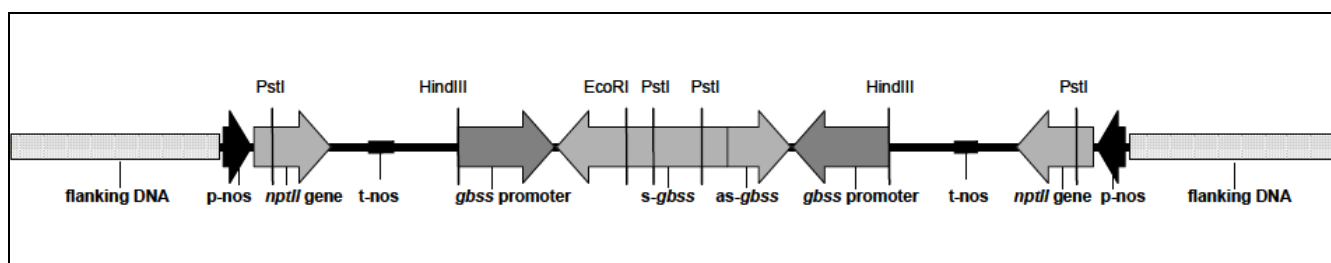


Figure 2. Structure de l'insertion dans EH92-527-1 (Part I Technical Dossier, Dossier EFSA/GMO/UK/2005/14)

²⁴ La pomme de terre est tétraploïde, elle a quatre versions de chaque chromosome

En clair, l'insertion d'ADN transgénique dans la pomme de terre EH92-527-1 englobe :

- une cassette d'expression de *nptII* entière, comprenant :
 - le promoteur *p-nos* (371 pb)
 - le gène *nptII* (784 pb)
 - la région de polyadénylation *t-nos* (255 pb)
- une chimère de la cassette d'expression du fragment de *gbss*, comprenant :
 - le promoteur *p-gbss* (987 pb)
 - un fragment génomique (1755 pb au lieu de 1943 pb dans l'ADN-T d'origine) de la séquence codante du gène *gbss* en orientation « antisens »
 - un fragment génomique (680 pb au lieu de 1943 pb) de la séquence codante du gène *gbss* en orientation « sens » par rapport au premier promoteur, et « antisens » par rapport au promoteur suivant
 - une autre copie du promoteur *p-gbss* (987pb) en orientation inverse par rapport à la première copie de *p-gbss*
- une deuxième cassette d'expression de *nptII* entière :
 - la région de polyadénylation *t-nos* (255 pb)
 - le gène *nptII* (784 pb)
 - le promoteur *p-nos* (371 pb)

L'insertion comporte ainsi deux cassettes d'expression de *nptII* complètes —une à chacune de ses extrémités—, et en son centre, une séquence chimérique de fragments du gène *gbss* encadrée de deux promoteurs centripètes. Le dossier du pétitionnaire étant flou sur les séquences de *gbss* effectivement présentes dans cette fusion, le Comité scientifique du HCB a réalisé une analyse bioinformatique approfondie des séquences d'ADN fournies par le pétitionnaire. Le fragment de séquence codante de *gbss* figurant dans l'ADN-T d'origine a été tronqué de 188 pb dans la première copie et de 1263 pb dans la seconde copie inversée. La séquence du petit fragment est donc entièrement dupliquée dans la séquence du grand fragment en orientation inverse. La séquence de polyadénylation placée après la séquence de *gbss* dans l'ADN-T d'origine n'a pas été transférée.

L'événement EH92-527-1 n'a vraisemblablement pas été sélectionné en fonction de cette structure complexe d'insertion. L'insertion initialement prévue était la construction présente sur l'ADN-T du plasmide pHxowG. Cet événement, résultant d'une délétion de la bordure gauche de l'ADN-T puis d'une duplication incomplète de la construction avant intégration en sens opposés, a été sélectionné sur l'efficacité du phénotype recherché, soit l'efficacité d'inhibition de l'enzyme GBSS. La transcription initiée au niveau de chaque promoteur de *gbss* au sein de cette construction réarrangée conduit vraisemblablement à l'hybridation des fragments d'ARN de *gbss* en une structure d'épingle à cheveu, ce qui pourrait augmenter l'efficacité de la suppression de la fonction du gène *gbss* endogène. Aucune donnée suggérant le mécanisme moléculaire de l'inhibition n'est présente dans le dossier du pétitionnaire.

- Séquençage de l'insert et des régions flanquantes

Le séquençage de plus de 2400 pb des régions flanquant l'insertion montre que celle-ci a eu lieu dans une région de séquences répétées du génome. L'analyse bioinformatique indique qu'aucun gène de la pomme de terre n'est interrompu par l'insertion.

- Stabilité et héritabilité des transgènes et de leur phénotype

Les études réalisées sur plusieurs générations de tubercules EH92-527-1 montrent que le caractère induit par la construction insérée est stable : la diminution de la teneur en amylose de 21% à moins de 2% a été vérifiée sur une période de 3 ans.

- Analyse bioinformatique des ORF²⁵ potentielles présentes dans l'insertion EH92-527-1

Dix-huit ORF potentielles qui coderaient des peptides de plus de 50 aa peuvent être mis en évidence dans l'insertion, incluant celles codant NPTII. Onze d'entre eux n'ont pas d'homologie avec des séquences de protéines connues. Les six autres, qui montrent des homologies plus ou moins fortes avec des protéines connues, ont été intensivement étudiés. Seule l'ORF4 pourrait être théoriquement co-transcrite²⁶ avec le gène *nptII*. Cette ORF correspond aux 50 premiers acides aminés de la protéine conférant une résistance à la bléomycine. Cependant, étant précédée par un codon stop et n'étant pas en phase avec la séquence codante de *nptII*, elle ne peut pas être produite en fusion avec NPTII. En conformité avec ces observations, l'ORF4 est transcrit mais pas traduit. Des tests immunologiques n'ont pas permis de détecter la synthèse de cette éventuelle protéine. Le sous-clonage de cette ORF dans un vecteur bactérien permettant son expression ne permet pas non plus la multiplication de la bactérie sur milieu sélectif contenant de la bléomycine.

- Expression des transgènes dans la pomme de terre EH92-527-1

L'expression du gène *nptII* est *a priori* constitutive²⁷ car sous le contrôle du promoteur du gène *nos*. L'analyse du dossier C/SE/96/3501 de la quantité de protéine présente dans les feuilles et les tubercules indique une concentration variant de 1,8 à 5,7 ng/g de tissu frais dans les jeunes feuilles. La protéine n'est plus détectable dans les feuilles de plantes âgées de plus de 78 jours. Cette teneur est de 31 ng/g de tubercule cru. La protéine NPTII n'est pas détectable dans l'amidon, ni dans le tubercule bouilli pendant une minute.

L'expression du fragment d'ADN de la séquence codante du gène *gbss* sous le contrôle de son promoteur ne produit pas de protéine. L'ARN induit l'inhibition de la production, et donc de la fonction, de la protéine GBSS endogène de la pomme de terre. L'analyse électrophorétique d'extraits totaux de protéines de tubercule montre que la protéine GBSS, n'est pas détectable dans la pomme de terre EH92-527-1, alors qu'elle représente de l'ordre de 80% des protéines totales dans la variété Prevalent non transgénique (Dossier EFSA/GMO/UK/2005/14, Annexe 8).

3. Evaluation de l'impact sur la santé humaine et animale

L'impact sur la santé humaine et animale de la pomme de terre EH92-527-1 est évalué à deux niveaux : un niveau direct, lié à la consommation du produit, et un niveau indirect, lié à l'éventualité du transfert de la résistance aux antibiotiques conférée par le gène *nptII*.

Concernant le premier niveau, le CS a évalué l'impact associé à la consommation des co-produits de la transformation industrielle de la pomme de terre EH92-527-1 par les animaux, usage revendiqué par le pétitionnaire, et l'impact associé à une consommation accidentelle, humaine ou animale, de la pomme de terre ou de ses produits. Trois co-produits peuvent être issus de l'utilisation industrielle de la pomme de terre EH92-527-1 : la pulpe, la phase liquide et les eaux de rinçage de l'amidon. Ces deux derniers produits sont généralement épanchés

²⁵ ORF (*Open Reading Frame*) : cadre ouvert de lecture, détecté par des programmes informatiques, correspondant à une séquence d'ADN qui peut coder, par transcription puis traduction, une protéine ou un peptide (petite protéine). A la suite de la détection informatique d'un ORF, des analyses supplémentaires sont réalisées pour tester s'il est effectivement transcrit en ARN et traduit en protéine ou en peptide.

²⁶ La transcription est une étape indispensable précédant la traduction, qui seule produira l'éventuel peptide.

²⁷ On dit d'un gène qu'il s'exprime de façon constitutive quand il s'exprime en permanence.

sur le sol et ne concernent pas la sécurité de l'homme et de l'animal. La pulpe est destinée aux animaux, plus particulièrement aux ruminants, les monogastriques ne digérant pas l'amidon cru de pomme de terre. La seule protéine « nouvelle » produite par la pomme de terre EH92-527-1 du fait de la transformation génétique, est la protéine NPTII, d'origine bactérienne.

Concernant le deuxième niveau, en conformité avec l'article 4 de la directive 2001/18/CE et sa transposition dans l'article 19 de la loi du 25 juin 2008, (Articles L. 533-3 et L.533-5 du Code de l'environnement), le CS du HCB a procédé à l'évaluation des risques potentiellement associés au gène de résistance aux antibiotiques *nptII*, les textes juridiques stipulant qu'aucun organisme génétiquement modifié ne serait autorisé au-delà du 1^{er} janvier 2009 s'il contenait des gènes de résistance aux antibiotiques dont l'évaluation des risques conclurait qu'ils sont susceptibles d'avoir des effets préjudiciables sur l'environnement ou la santé publique.

3.1 Evaluation des risques sanitaires associés au gène *nptII*

- Sécurité de la protéine NPTII

Toxicité par administration unique.

L'éventuelle toxicité de la protéine NPTII a été évaluée dans le cadre de demandes antérieures pour d'autres plantes génétiquement modifiées contenant le gène *nptII*, notamment le maïs MON863 (EFSA, 2004a, b). L'étude de la toxicité par administration unique par voie orale chez la souris a fait l'objet d'une publication (Fuchs et al., 1993b). Compte tenu de sa faible expression dans la pomme de terre EH92-527-1 et des difficultés d'extraction et de purification à partir de la pomme de terre, la protéine NPTII utilisée dans l'étude de toxicité a été produite *via Escherichia coli*. L'équivalence entre les protéines produites dans différentes plantes génétiquement modifiées, incluant la pomme de terre, et *E. coli*, avait été précédemment démontrée à partir de différentes analyses (séquence N-terminal, Western-blot, activité enzymatique), ainsi que l'absence de glycosylation (Fuchs et al., 1993a).

La protéine a été administrée chez dix animaux de chaque sexe en deux temps (à quatre heures d'intervalle) en raison de la limite de solubilité.

Conclusion : Aucun effet léthal n'est observé lors des sept jours d'observation qui suivent l'administration de doses de 100, 1000 ou 5000 mg NPTII/kg pc²⁸ chez la souris. La plus forte dose est 1 million de fois plus importante qu'une consommation hypothétique extrême chez l'homme (consommation exclusive de cette pomme de terre).

Dégradation en milieu digestif

Les ruminants sont l'espèce cible type pour l'utilisation de produits dérivés de la pomme de terre comme la pulpe. La dégradation de la protéine NPTII a été étudiée *in vitro* à partir du contenu du rumen obtenu par fistule chez le mouton. La quantité de protéine incorporée au fluide a été équivalente ou supérieure à celle susceptible d'être apportée par l'alimentation (0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml et 100 ng/ml).

Conclusion : La protéine NPTII est rapidement dégradée en milieu digestif de ruminants. Dans une simulation de milieu digestif humain, NPTII est dégradée en dix secondes en milieu gastrique et en quinze minutes en milieu intestinal (Fuchs et al., 1993b).

- Evaluation de l'impact sanitaire associé à un transfert éventuel de la fonction de résistance aux antibiotiques du gène *nptII*

La pomme de terre EH92-527-1 exprime le gène *nptII*, qui confère une résistance à certains antibiotiques de la famille des aminoglycosides. L'EMA (European Medicines Agency)²⁹ souligne l'importance des aminoglycosides dans l'arsenal thérapeutique anti-bactérien dans

²⁸ Poids corporel

²⁹ Agence européenne des médicaments dont la mission est de protéger et de promouvoir la santé humaine et animale pour l'Union Européenne à travers l'évaluation et la supervision des médicaments à usage humain et vétérinaire.

son rapport de 2007 (EMEA, 2007). Le gène *npfII* confère la résistance à la kanamycine, la néomycine, la généticine et la paromomycine (Shaw et al., 1993). La néomycine et la paromomycine sont utilisées en application locale, la néomycine sous forme de collyre. La kanamycine est un antibiotique de réserve, utilisé contre les mycobactéries multirésistantes (*i.e.* résistantes à au moins la rifampicine et l'isoniazide). La prévalence de souches de *Mycobacterium tuberculosis* multirésistantes est en augmentation, avec une incidence pouvant atteindre jusqu'à 6,5% des nouveaux cas de tuberculose dans certaines régions du monde (Devaux et al., 2009). Néanmoins, à ce jour, la résistance aux aminoglycosides chez *M. tuberculosis* relève uniquement de mutations altérant leur cible moléculaire (Nair et al., 1993). Il est important de noter que l'activité antibiotique de la gentamicine, aminoglycoside le plus utilisé en clinique humaine, n'est pas affectée par le gène *npfII*.

Le gène *npfII* est ubiquiste dans le monde microbien et il est largement représenté au sein des bactéries commensales du tube digestif de l'homme et des animaux ainsi que dans les échantillons de sol quand ceux-ci sont sous influence anthropique (champs amendés par des fumiers provenant d'animaux traités, proximité des sites hospitaliers) mais beaucoup moins dans des sols plus « naturels » (Alvarez and Mendoza, 1992; Smalla et al., 1993). Les études de prévalence ont montré la présence de ce gène chez 2,5% des isolats bactériens à Gram négatif résistants à la kanamycine et à la néomycine (Alvarez and Mendoza, 1992). On signalera que la résistance à la kanamycine peut aussi être conférée par le gène *npfI*, mis en évidence chez 90% de ces souches (Alvarez and Mendoza, 1992). Le gène *npfII* a été détecté sur des éléments génétiques mobiles comme le transposon composite *Tn5* et des plasmides responsables de sa dissémination dans le monde bactérien.

Comme explicité dans le chapitre 4.3 (Dissémination potentielle vers les bactéries), la probabilité de modification phénotypique de bactéries pathogènes de l'homme suite au transfert à partir de plantes transgéniques de la résistance induite par le gène *npfII* est très faible. Plusieurs événements, qui indépendamment ont une probabilité d'occurrence très faible, doivent successivement se réaliser pour qu'un tel scénario se réalise.

- Le point le plus important est le franchissement de la barrière génétique bactérienne nécessitant une similarité de séquences entre les gènes clonés dans la plante et le génome des bactéries du sol. Cette similarité de séquences est en effet indispensable à l'étape de recombinaison homologue ou homéologue. En laboratoire, des événements de transfert plantes transgéniques-bactéries ont été détectés seulement si cette condition moléculaire est remplie (voir chapitre 4.3). Le transfert dans des zones sans forte similarité demeure théoriquement possible, impliquant un mécanisme de recombinaison illégitime mais ne pouvant se réaliser qu'à des fréquences extrêmement faibles, de plusieurs ordres de grandeur inférieures à la recombinaison homologue. Ces données indiquent que le gène *npfII* de la plante ne pourrait être potentiellement transféré que dans le génome des bactéries possédant déjà ce gène, sans même ajouter une copie supplémentaire mais en remplaçant la copie existante.
- Du fait du système d'expression eucaryote de la construction du gène *npfII* dans la plante transgénique, l'expression de ce gène dans les bactéries réceptrices nécessiterait des séquences d'expression procaryotes préexistant dans la zone d'insertion du transgène ou captées lors de son transfert.
- De plus, pour qu'un tel transfert ait des conséquences en santé humaine ou animale, il faudrait que les bactéries réceptrices du gène *npfII* soient des pathogènes d'hommes ou d'animaux dont le traitement nécessite l'usage d'antibiotiques contre lesquels *npfII* confère une résistance, ou qu'un second événement de transfert se réalise entre une bactérie saprophyte du sol qui aurait acquis le transgène et ces microorganismes pathogènes. Des bactéries pathogènes de l'homme, dont l'optimum de température est de 37°C, ont généralement une capacité d'adaptation limitée à l'environnement tellurique. Par exemple, après deux semaines d'incubation dans le sol, la population d'*E. coli* descend sous le seuil de détection. Beaucoup de ces microorganismes dont le portage est exclusivement humain, comme *M. tuberculosis*, ont donc des temps de résidence limités dans le sol, qu'ils ne colonisent que très transitoirement à la suite de leur inoculation notamment par et dans les crachats des patients. Des études montrent toutefois que *M. bovis* et *M. avium*, peuvent persister plus longtemps que *M. tuberculosis* dans l'environnement dans des conditions physico-chimiques particulières à proximité d'animaux infectés (Biet et al., 2005; Humblet et al., 2009; Young et al., 2005).

Les bactéries pathogènes trouvent au sein de la communauté bactérienne commensale une source bien plus prolifique de déterminants génétiques conférant la résistance à la kanamycine que les plantes transgéniques. Le réservoir pour de tels gènes est très vaste, comme indiqué plus haut, et ces gènes sont localisés sur des éléments génétiques spécifiquement adaptés à leur dissémination comme des plasmides ou des transposons (*Tn5* notamment) transférables par des mécanismes comme la conjugaison, dont les fréquences de réalisation sont très élevées en comparaison de la transformation qui est le seul mécanisme susceptible de permettre à la bactérie d'acquérir l'ADN de la plante.

Concernant le gène *npII* de la pomme de terre EH92-527-1, son transfert vers des bactéries saprophytes du sol serait possible mais sans conséquence, puisque l'événement le plus probable consisterait au remplacement d'une copie déjà existante de ce gène. La prévalence naturellement élevée de la résistance à la kanamycine dans les bactéries environnementales et commensales exclurait tout effet délétère si une ou quelques copies supplémentaires venaient à être incorporées dans d'autres régions du génome par recombinaison illégitime et selon une configuration peu probable où le gène, sous système d'expression eucaryote dans la plante, pourrait être exprimé dans la bactérie. De plus, la probabilité que cette bactérie soit un pathogène humain (*M. tuberculosis* notamment) est faible, considérant que ces microorganismes ne sont que des résidents transitoires du sol et qu'un transfert de la copie potentiellement récupérée par une bactérie saprophyte à un pathogène ajoute une étape supplémentaire de transfert, donc baisse encore la fréquence de réalisation. Enfin, les bactéries pathogènes trouvent dans les bactéries commensales, généralement équipées d'éléments génétiques spécialisés pour le transfert d'ADN, une source de gènes de résistance bien mieux fournie et plus accessible que le génome de la pomme de terre EH92-527-1.

3.2 Sécurité de l'aliment en l'état

- Toxicité par administration répétée par voie orale sous forme d'aliment

L'étude de toxicité par administration répétée sur 90 jours a été conduite chez le rat Wistar (35±1 jours) hébergé en cage individuelle. Trois groupes de 20 animaux (10 mâles et 10 femelles) ont reçu une alimentation contenant soit 5% de pomme de terre EH92-527-1 lyophilisée, soit une quantité identique d'une lignée parentale, soit un régime standard. Les paramètres suivants ont été enregistrés : état général, mortalité, consommation hydrique (quotidien), évolution pondérale, consommation et efficacité alimentaires, comportement dans le test de l'open field (hebdomadaire), examen ophtalmique (avant et fin d'étude). Le comportement en relation avec le système nerveux central a été étudié en fin d'étude via le test FOB (Functional Observational Battery), ainsi que l'activité motrice par le test de l'actimètre. Des examens hématologiques et d'hémostase (16 paramètres), de biochimie sanguine (19 paramètres) et urinaire (12 paramètres) ont été pratiqués en fin d'étude. A l'autopsie, les organes ont été examinés macroscopiquement (n=38), certains ont été pesés (n=12) puis examinés microscopiquement (n=15).

Quelques variations statistiquement significatives sont observées sur les paramètres hématologiques, le poids des organes, et l'examen histologique. Une augmentation de la lignée blanche en relation avec celle des neutrophiles et une augmentation du poids de la rate sont observées chez les femelles dans le groupe EH92-527-1 en comparaison à la lignée parentale. Les valeurs observées restent dans les limites des données historiques et aucun autre organe lymphoïde ne présentant de différences, aucune conséquence toxicologique n'est à déduire de ces variations isolées. De même, l'examen histologique conclut à une augmentation légère de la présence de vacuoles dans la thyroïde des mâles du groupe EH92-527-1 en comparaison avec les animaux du groupe régime standard. L'absence d'une telle incidence chez les femelles du groupe EH92-527-1, le fait que de tels événements sont communs chez le rat en fonction de l'âge (Takaoka et al., 1995), et l'absence de modifications cliniques, comportementales ou biologiques concomitantes, ne permettent pas d'imputer au régime un effet sur la fonction thyroïdienne.

Conclusion : L'apport quotidien de pomme de terre EH92-527-1 sous forme lyophilisée à raison de 5% dans l'aliment pendant 90 jours n'a pas entraîné d'effets délétères chez le rat.

3.3 Allergénicité

L'allergénicité potentielle ne pouvant être évaluée à partir d'un seul test, l'approche recommandée est celle du « poids de l'évidence » qui repose sur un faisceau d'arguments (EFSA, 2006a).

Les arguments pris en compte sont les suivants :

- la source du gène à l'origine de la protéine d'intérêt,
- les caractéristiques de l'organisme receveur,
- l'absence d'homologie de séquence de la protéine par rapport aux protéines toxiques ou allergènes connues,
- l'absence de glycosylation de la protéine,
- la rapide digestion *in vitro* de la protéine en milieu gastrique ou intestinal simulé (la protéine NPTII est dégradée intégralement en moins de 10 secondes en milieu gastrique humain reconstitué, et en 15 min en milieu humain digestif reconstitué),
- la très faible teneur en protéine NPTII dans la pulpe et le tubercule crus (respectivement 55 et 31 ng/g de poids frais, ce qui correspond respectivement à 0,00082% et 0,00068% de la fraction protéique de ces tissus) et son absence dans l'amidon et le tubercule cuit.

La pomme de terre n'est pas connue comme présentant des caractéristiques d'allergénicité ni susceptible de surexprimer une protéine allergisante. La dégradation de la protéine NPTII a par ailleurs été démontrée en milieu digestif simulé.

L'étude *in silico* de la protéine putative codée par l'ORF4 montre qu'il existe un fort degré de similitude avec une partie de la protéine de résistance à la bléomycine via le transposon Tn5 de *E. coli* et l'ornithine cyclodéaminase de *A. tumefaciens*, indiquant que cette construction génétique a été utilisée pour introduire la modification. Ces protéines ne sont pas connues pour être toxiques ou allergisantes. Par ailleurs, la séquence qui présente une similitude n'est pas fonctionnelle, ainsi que l'a démontré le transfert de ORF4 dans *E. coli* (voir chapitre 2.4 et Annexe 16).

Conclusion : La protéine NPTII ne présente pas de séquence commune avec des composés toxiques ou des allergènes connus et elle est rapidement dégradée en milieu digestif. La pomme de terre n'est pas connue comme allergénique. En conséquence aucun potentiel d'allergénicité n'est attendu de la pomme de terre EH92-527-1.

3.4 Alimentarité chez une espèce cible.

- Etude d'alimentarité chez la génisse .

La pulpe de pomme de terre étant destinée aux ruminants, une étude d'alimentarité a été menée sur huit semaines chez 32 génisses de 13 à 19 mois, réparties en deux groupes et, de façon équilibrée, en quatre classes selon leur poids initial.

Conclusion : Aucune différence significative n'est rapportée sur la consommation et la croissance pondérale entre les régimes à base de pomme de terre EH92-527-1 et de pomme de terre conventionnelle. Il n'est pas observé de différences sur l'état général des animaux et leur fonction intestinale.

3.5 Considérations statistiques

Les études statistiques auxquelles se réfère le pétitionnaire sont des tests de comparaison et les conclusions des différentes études décrites ci-dessus (toxicité, toxicité sub-chronique, alimentarité) sont "correctement énoncées" d'un point de vue statistique, à savoir qu'on n'observe pas de différences statistiquement significatives avec le contrôle quasi-isogénique.

Le pétitionnaire ne conclut pas pour autant à une quelconque équivalence ou absence totale de risque.

Malgré tout, ces études en restent là et ne cherchent pas à savoir si un éventuel effet biologiquement significatif pourrait être détecté avec les protocoles adoptés. En d'autres termes, aucune étude de puissance n'est proposée alors que les effectifs sont restreints dans ces études (10 animaux par groupe pour les études de toxicité et 16 pour l'étude d'alimentarité). L'AESA a proposé de nouvelles lignes directrices sur l'analyse statistique (EFSA, 2009b), qui devraient être appliquées à l'avenir.

Par ailleurs, le CS du HCB souhaiterait que les données brutes soient fournies sous forme numérique et analysable.

4. Evaluation des risques pour l'environnement

Les risques potentiels pour l'environnement de la culture d'une plante génétiquement modifiée incluent les conséquences d'une dissémination de transgènes. Suite à la mise en culture de la pomme de terre EH92-527-1, le transgène *nptII* pourrait théoriquement être disséminé *via* le pollen, les graines ou les tubercules, ou par un transfert d'ADN vers des bactéries.

4.1 Dissémination potentielle par le pollen et les graines

- Reproduction sexuée intraspécifique

La reproduction sexuée existe chez la pomme de terre, mais n'est pas le mode courant de multiplication. La floraison est favorisée par certaines conditions de milieu : jours longs, fortes intensités lumineuses, températures élevées. Les fleurs, préférentiellement autogames, ne produisent pas de nectar ; elles sont donc assez peu attractives pour les insectes. Par ailleurs, elles sont souvent stériles : 70% des cultivars de pomme de terre sont mâles stériles et des phénomènes de dégénérescence des ovules sont également très fréquents à différents stades de développement. Ainsi, la fructification en conditions non contrôlées est un phénomène aléatoire qui dépend beaucoup du génotype. Les croisements entre les variétés sont souvent difficiles et le taux d'allogamie dans un croisement en conditions naturelles est inférieur à 10% (Rossignol and Rousselle-Bourgeois, 1996). La pollinisation est assurée par les insectes, car le pollen est lourd et peu anémophile (Rousselle-Bourgeois and Rousselle, 1996).

La variété Prevalent, fond génétique de l'événement EH92-527-1, est assez peu florifère (<http://3w.europotato.org>) et forme très rarement des fruits. Par ailleurs, le pollen formé sur les fleurs est peu fertile. La transformation génétique réalisée n'a pas conduit à une amélioration de la fertilité pollinique chez la pomme de terre EH92-527-1, ni à une modification de son aptitude à fleurir qui reste aléatoire. Ainsi le risque de flux de gène par la formation de baies sur la pomme de terre EH92-527-1 ou des variétés cultivées à proximité et pollinisées par la pomme de terre EH92-527-1 est faible.

- Capacité à former des structures de survie ou de dormance

La graine peut, si elle se forme —ce qui est rare chez les cultivars de pomme de terre, et très rare chez Prevalent en particulier—, constituer un organe de survie de la plante. Elle est enfermée dans des baies qui tombent et se détachent à maturité (6 à 8 semaines après pollinisation). Selon le cas, le nombre de graines par baie peut aller de quelques unes à plus de 200 (Rousselle-Bourgeois and Rousselle, 1996). Les graines, d'abord dormantes, peuvent germer après une période de froid et si elles sont mises dans de bonnes conditions. Conservées au froid pendant plusieurs années, les graines peuvent garder une grande part de leur faculté germinative. Cependant, il n'y a pas de raison, *a priori*, que la transformation opérée donne aux graines issues de la pomme de terre EH92-527-1, ou issues de croisement

avec la pomme de terre EH92-527-1, une capacité de survie supérieure à celle d'autres graines de pomme de terre. Ce point mériterait toutefois d'être confirmé au regard de modifications probables des réserves présentes dans la graine et liées à la modification génétique.

- Pouvoir de dissémination des graines

Les graines ont un pouvoir propre de dispersion très faible compte tenu du fait qu'elles sont contenues à l'intérieur de baies dont le poids ne permet pas un transport à longues distances. Les baies tombent en général au pied du plant-mère et les graines germent sur place, si elles trouvent des conditions favorables.

Dans les champs, les facteurs pouvant affecter la capacité à se développer des jeunes plantules issues de graines sont la température, les parasites, les pratiques culturales. Ainsi des hivers rigoureux, des attaques de mildiou (*Phytophthora infestans*) peuvent détruire plus ou moins complètement des plantules non traitées. Dans les parcelles agricoles, les pratiques culturales et les rotations permettent normalement de détruire les jeunes plantules, avant que celles-ci aient pu former des tubercules.

Cependant un transport des baies et graines par les animaux (oiseaux, mammifères) ne peut être exclu. La graine peut ainsi donner naissance à des plantules en dehors du champ. Il est toutefois admis que les plantules de pomme de terre ont un faible pouvoir de compétition vis-à-vis des autres graines en conditions naturelles.

- Temps de génération et aptitude à la floraison

La durée du cycle végétatif de la pomme de terre est très variable : de 90 à 150 jours en France. Ce caractère n'a pas été altéré par la transformation génétique, si bien que la pomme de terre EH92-527-1 n'a aucun avantage sélectif en termes de capacité à se multiplier par voie sexuée par rapport à la variété non transformée Prevalent.

- Compatibilité sexuelle avec d'autres espèces végétales sauvages ou cultivées

Les possibilités d'hybridation avec des espèces apparentées sauvages sont considérées comme nulles dans les pays européens, et limitées en Amérique du Nord, du fait de l'absence d'espèces compatibles (Love, 1994). Des hybrides interspécifiques ont été obtenus entre la pomme de terre cultivée et des espèces botaniques comme *Solanum fendleri* et *S. jamesii* (présentes aux Etats-Unis) par recours à des techniques d'hybridation relativement complexes (sauvetage d'embryons *in vitro*, recours à des espèces "pont" en intermédiaires). La situation est la même en Europe pour la morelle noire (*S. nigrum*), espèce avec laquelle l'hybridation ne semble possible qu'en conditions artificielles.

En Amérique du Sud, zone d'origine et de diversification de la pomme de terre, les possibilités d'hybridations interspécifiques sont, au contraire, bien réelles. Il existe en effet de nombreuses possibilités de croisement entre les 1000 espèces que compte le genre *Solanum* L., dont les génomes peuvent être si proches structurellement que les hybrides interspécifiques obtenus ont un comportement méiotique régulier (Rossignol and Rousselle-Bourgeois, 1996). Ceci est particulièrement vrai au niveau diploïde, un peu moins au niveau tétraploïde, où les phénomènes d'incompatibilité ou de stérilité mâle limitent dans la pratique les possibilités de croisement. La pomme de terre EH92-527-1 dans le fond génétique Prevalent étant peu florifère et pratiquement mâle stérile, les risques de flux de gènes vers des espèces apparentées par croisement sexué sont inexistantes en France.

4.2 Dissémination potentielle par voie végétative

- Une espèce à multiplication végétative préférentielle

La pomme de terre est une espèce à multiplication végétative par formation de tubercules à l'extrémité de stolons qui est sous la dépendance de plusieurs facteurs : photopériode, température. L'alimentation de la plante et le tubercule-mère ont aussi un rôle important dans le déclenchement et le déroulement du processus (Ellissèche, 1996). Les transgènes de la pomme de terre EH92-527-1 n'ont pas altéré les capacités de multiplication de la plante par voie végétative et n'ont pas d'incidence sur son comportement agronomique, ni sa capacité à produire des tubercules.

- Capacité à former des structures de survie ou de dormance

Les tubercules, organes de réserve riches en eau et en substances nutritives, constituent pour la pomme de terre le moyen essentiel de survie. Laissés en terre et en l'absence de gel, ils germent dès que les conditions climatiques deviennent favorables. Pendant la phase de levée, la plante est d'abord dépendante des réserves du tubercule-mère puis devient rapidement autonome et recommence un cycle végétatif (Ellissèche, 1996). Le problème des repousses peut ainsi devenir aigu dans des parcelles où de nombreux tubercules auraient été laissés en terre (Van Kempen et al., 1996). En revanche, ces problèmes se limitent en général aux parcelles cultivées, car la plante a un pouvoir de colonisation relativement faible. En ce qui concerne la pomme de terre EH92-527-1, la transformation génétique ne semble pas avoir modifié les caractéristiques des tubercules en termes de dormance et de possibilités de levée. Les problèmes de repousses pour cette variété ne devraient donc pas être plus importants que ceux posés par d'autres variétés.

- Facteurs spécifiques affectant la capacité de survie

Les facteurs pouvant affecter la capacité de survie des tubercules sont également la température, les parasites, les pratiques culturales. Ainsi des hivers rigoureux détruisent en général les repousses de tubercules dans les champs. De même, des attaques de mildiou (provoqué par *Phytophthora infestans*) peuvent détruire plus ou moins complètement des plantes non traitées. Enfin, les rotations qui sont effectuées dans les parcelles permettent en général d'éliminer les repousses, par ailleurs difficilement évitables après une récolte mécanisée. Pour éviter le problème des repousses, il est recommandé en France de n'introduire la pomme de terre dans la rotation que tous les 4 ans. Par ailleurs, il existe des pratiques culturales (fauchages réguliers, utilisation de cultures étouffantes ou d'herbicides) pour détruire les repousses lorsqu'elles sont présentes. Les tubercules de la pomme de terre EH92-527-1 ne présentant aucun avantage sélectif par rapport à ceux de Prevalent, il n'y a pas de raison de voir apparaître des problèmes au niveau des rotations qui soient plus aigus que ceux actuellement rencontrés avec les variétés non transgéniques.

- Forme et étendue de la dissémination

La dissémination par le biais des tubercules est un processus assez lent. Le tubercule se forme à l'extrémité de stolons. Ceux-ci peuvent être plus ou moins longs selon les variétés et les conditions de milieu, mais les variétés cultivées à l'heure actuelle ont en général des stolons assez courts. Ainsi, le pouvoir de colonisation de la plante est relativement faible. Le taux annuel de multiplication est compris entre 4 et 10. Dans certaines conditions particulières (abandon de parcelles) on peut voir des variétés de pomme de terre s'établir de façon plus ou moins pérenne, mais cet établissement reste limité dans l'espace et s'avère rapidement réversible en cas de nouveau travail du sol.

4.3 Dissémination potentielle vers les bactéries du sol (Transfert de gène horizontal)

La possibilité de transfert de gènes entre plantes transgéniques et bactéries de l'environnement a été démontrée au 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 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 transgénique 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 transgéniques pourraient également être intégrées dans les génomes bactériens par recombinaison illégitime mais à des fréquences extrêmement faibles. De plus, de telles séquences constituant un fardeau génétique pour la bactérie puisque, ne pouvant s'y exprimer, elles ne sont pas fixées dans ces génomes comme le montre l'analyse des séquences des génomes bactériens, dans lesquels très peu de séquences d'origine végétale sont détectées.

Pour évaluer les potentialités de transfert des transgènes de la plante étudiée aux bactéries de l'environnement, il convient donc en premier lieu de se référer à la description de l'insertion transgénique et l'origine des gènes et des séquences qui la composent (voir chapitre 2.2). Les séquences rentrant dans la catégorie des régions d'ADN pouvant être transférées à des fréquences plus élevées que les autres gènes de la plante, c'est-à-dire les séquences d'origine bactérienne, sont celles du gène *npII*, gène marqueur conférant la résistance à la kanamycine et à la néomycine.

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 le gène *npII*, pourrait aboutir potentiellement au co-transfert des régions adjacentes, comprenant les autres séquences du transgène et celles du chromosome de la plante situées près des sites d'intégration du transgène. De tels événements ont en effet été détectés dans le cadre d'études sur un autre couple modèle plante transgénique-bactérie réceptrice (Gebhard and Smalla, 1998). Les fréquences de tels événements sont extrêmement basses. Rappelons enfin que de tels événements de transfert de gène, 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, l'avantage sélectif que de tels événements de transfert pourraient conférer à une bactérie réceptrice, s'ils venaient à se réaliser, serait limité compte tenu des caractéristiques de la construction génétique. Le gène *npII* a en effet été cloné dans la plante sous le contrôle d'un promoteur permettant son expression en systèmes eucaryotes, sans possibilité d'expression de ce gène dans les bactéries.

Considérons cependant le cas où l'intégration dans le génome d'une bactérie se réalise de telle sorte que le gène *npII* puisse effectivement s'y exprimer. La question serait alors de savoir si des bactéries ayant acquis le gène *npII* à partir de la plante pourraient avoir un impact sur l'équilibre populationnel et fonctionnel de la communauté bactérienne, ou en d'autres termes, si un avantage sélectif pourrait être directement associé à cet événement. L'impact dépendrait principalement de deux facteurs, la concentration de cet antibiotique dans l'environnement, et l'occurrence de bactéries déjà résistantes à cet antibiotique. Plus de 70% des antibiotiques commercialisés sont des substances naturelles produites par des microorganismes du sol. Il est donc logique que ces molécules soient présentes dans ces

environnements, synthétisées *in situ* par ces microorganismes producteurs quoiqu'à des concentrations faibles, détectables par l'emploi de systèmes biologiques rapporteurs mais très difficilement par des approches chimiques. Tout aussi logique est donc la présence de bactéries résistantes, considérant que si certains microorganismes producteurs ont développé ces composés chimiques pour accroître leur valeur adaptative, d'autres ont développé la parade moléculaire pour se soustraire à l'effet létal de ces molécules.

C'est ainsi que la proportion de bactéries résistantes à la kanamycine dans le sol est importante. Par exemple, Smalla et collaborateurs rapportent des valeurs comprises entre 0,01 et 0,56% selon les sols (Smalla et al., 1993), soit, en valeur absolue, jusqu'à 1 million de bactéries résistantes à la kanamycine par gramme de sol, si l'on considère qu'un gramme de sol contient entre 100 millions et plus de 1 milliard de cellules bactériennes. La question subséquente est de déterminer si le gène *npfII* est impliqué dans la résistance à la kanamycine chez ces bactéries du sol.

Smalla et collaborateurs indiquent ne pas avoir détecté le gène *npfII* dans les trois sols (aux caractéristiques pédologiques différentes) qu'ils ont analysés (Smalla et al., 1993). Ces travaux ont été effectués sur des souches isolées à partir de ces sols (avec hybridation de colonies et sur l'ADN extrait), et sur de l'ADN directement extrait du sol puis amplifié par PCR. En revanche, le gène *npfII* est détecté dans des écosystèmes où l'influence des antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine ou animale est plus évidente (lisiers, fumiers, certains cours d'eau) (Smalla et al., 1993).

D'autres publications montrent des résultats convergents concernant l'absence du gène *npfII* dans le génome des bactéries du sol (Fredrickson et al., 1988; Holben et al., 1988; Pillai et al., 1991; Recorbet et al., 1993; Riesenfeld et al., 2004), que semblent confirmer les premiers résultats non publiés du séquençage systématique du métagénome (ensemble des génomes bactériens) d'un sol de référence (Vogel et al., 2009).

En résumé, et selon ces différents travaux publiés à ce jour, le gène *npfII* n'a jamais été détecté dans des bactéries de sols non soumis à des perturbations anthropiques par des antibiotiques, et ce quelles que soient les technologies utilisées (isolement bactérien ou ADN extrait de l'environnement). La limite de détection est estimée à 1000 cellules bactériennes par gramme de sol (Smalla et al., 1993), mais il est extrêmement difficile d'être précis sur ce point. Le gène *npfII* se différencie ainsi du gène *bla* TEM (résistance à l'ampicilline) du maïs Bt176 (Syngenta) qui présente une importante occurrence dans le sol avec un haut niveau de diversité (Demanèche et al., 2008).

Comment faut-il interpréter ces données sur la faible occurrence du gène *npfII* dans le sol ?

Comme déjà indiqué, le fait de ne pas détecter le gène *npfII* dans le sol ne signifie pas que la proportion de bactéries résistantes à la kanamycine est faible dans le sol. En revanche, la faible occurrence de ce gène dans les génomes bactériens telluriques signifie *de facto* un faible nombre de cibles susceptibles de permettre l'amorçage de la recombinaison avec le gène *npfII* intégré dans le génome de la plante. Ainsi, le fait que ce gène soit peu répandu décroît encore la possibilité qu'il soit transféré à partir de la pomme de terre transgénique. Toutefois, même s'il venait à être transféré et intégré dans des génomes bactériens par recombinaison illégitime, l'addition de ces quelques copies ne modifierait pas l'équilibre populationnel et fonctionnel de la communauté bactérienne du fait de la présence en nombre important de bactéries résistantes à la kanamycine grâce à des déterminants génétiques autres que le gène *npfII*.

5. Mesures propres à assurer la coexistence des filières

Les mesures propres à séparer la filière de la pomme de terre EH92-527-1 des filières de pomme de terre non transgéniques devront être appliquées au titre de la coexistence des filières selon la loi n° 2008-595 du 25 juin 2008.

5.1 Traçabilité de la filière EH92-527-1

Une méthode de détection spécifique de la pomme de terre EH92-527-1 a été validée en termes de performance par le CRL-GMFF³⁰. Du matériel de référence certifié est disponible auprès de l'IRMM³¹ et de l'AOCs³². La limite de détection absolue de EH92-527-1 est conforme aux besoins de détection pour vérifier l'absence de pomme de terre EH92-527-1 dans les produits destinés à l'alimentation humaine. EH92-527-1 possède un identifiant unique communautaire : BPS-25271-9.

En terme de quantification relative, le système de référence proposé par le pétitionnaire n'est pas fiable. Le système basé sur le gène UDP-Glucose Pyrophosphorylase présente des risques de réaction croisée avec d'autres séquences de solanacées (Rapport du CRL-GMFF : Protocole EH92-527-1³³). Le CS du HCB rappelle que, selon le règlement (CE) 1829/2003, le pétitionnaire doit fournir une méthode d'identification/quantification spécifique du taxon. Il lui est demandé en particulier de procéder à l'étude du nombre de copies et de la variation allélique du gène de référence utilisé sur une collection de variétés de pomme de terre représentatives de leur diversité génétique comme prévu dans les normes ISO 24276, 21569 et 21570 (ISO, 2005a, b, 2006) et recommandé dans les critères de validation ENGL^{34;35}. Les résultats devront être fournis au Laboratoire communautaire de référence pour diffusion.

Le pétitionnaire décrit des tests supplémentaires, comme le test immunologique sur feuille et tubercule basé sur la protéine NPTII, et le test iodométrique sur tubercule (Broothaerts et al., 2007). Le CS recommande que ceux-ci soient diffusés auprès des opérateurs qui ne seront pas sous contrat avec BASF Plant science pour faciliter les contrôles d'absence de plants et de tubercules de pomme de terre transgénique.

5.2 Système de ségrégation

Le pétitionnaire prévoit un système de préservation d'identité (*Identity Preservation system*) afin d'assurer la coexistence des filières et de limiter la présence fortuite de pomme de terre EH92-527-1 dans les produits destinés à l'alimentation humaine. Ce système contractuel entre le producteur de semences, le cultivateur et la féculerie permet un contrôle de la filière, ce qui ne prémunit *a priori* pas les autres opérateurs de toute contamination issue de cette filière. Le pétitionnaire indique que les semences de pomme de terre EH92-527-1 ne seront pas commercialisées hors contrat.

³⁰ 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, <http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/facilities/crl-gmff.htm>.

³¹ 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>.

³² American Oil Chemists' Society, association qui promeut le partage des connaissances et de l'information scientifique, <http://www.aocs.org/index.cfm>.

³³ Event-specific method for the quantification of amylopectin potato event EH92-527-1 using real-time PCR. <http://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/docs/C-SE-96-3501%20CRL%20method.pdf>

³⁴ ENGL (*European Network of GMO Laboratories*), réseau européen de laboratoires OGM dont l'objectif est d'améliorer la traçabilité des OGMs dans l'alimentation et la réglementation de leur utilisation en Europe. Le réseau développe et valide des méthodes pour la détection et la quantification des OGMs dans l'alimentation.

³⁵ Les critères de validation ENGL sont sur le site du CRL : <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/guidancedocs.htm>.

5.3 Mesures de coexistence au champ

En complément à ce système, le CS du HCB proposera aux autorités compétentes des mesures propres à permettre la coexistence entre les cultures de pomme de terre EH92-527-1 et les cultures de pomme de terre non transgénique au champ. Cette proposition sera élaborée au terme d'une réflexion approfondie sur la coexistence par le HCB à la suite de la publication du décret définissant les seuils de tolérance de présence d'ADN transgénique dans les produits dits « sans OGM ». Au vu des données disponibles, le CS peut d'ores et déjà indiquer les points suivants.

La multiplication de la pomme de terre se faisant par voie végétative, peu d'études scientifiques ont été consacrées à la pollinisation de la pomme de terre. Les quelques études publiées dans des revues à comité de lecture indiquent que le risque de pollinisation de plants de pomme de terre de parcelles voisines est relativement limité. Le flux de gènes par dispersion de pollen de pomme de terre a été mesuré, dans des conditions de champ en Angleterre, comme faible à 3 m (2%) et négligeable à 10 m (0.017%) (McPartlan and Dale, 1994).

Le pollen de pomme de terre est en effet généralement peu abondant, peu fertile, lourd et peu transporté par le vent (Rousselle-Bourgeois and Rousselle, 1996). Des études indiquent que certains insectes, comme le mégilèthe ou le bourdon en Irlande, peuvent transporter du pollen de pomme de terre (Conner and Dale, 1996; Petti et al., 2007; Skogsmyr, 1994)³⁶. Aucune étude n'a été réalisée en France sur ce sujet. Le flux de gènes par pollinisation pourrait donc être contrôlé par des mesures appropriées (distances inter-parcellaires, contrôle des insectes des parcelles transgéniques si nécessaire), qui devraient être définies après étude des conditions particulières de pollinisation de la pomme de terre, notamment par les insectes, en France.

Les repousses à partir de baies ou de tubercules peuvent être éliminées par des pratiques culturales de travail du sol ou d'utilisation d'herbicides. Des rotations d'une durée adaptée peuvent aussi contribuer à éviter les problèmes de repousses. Les rotations appliquées entre cultures de pomme de terre varient entre quatre et sept ans dans les pays européens. Or, les baies, certes rares en production industrielle, peuvent germer dix ans après leur enfouissement, d'après des études faites en Irlande (Askew and Struik, 2007; Flannery et al., 2005). Une durée de rotation adaptée devra être définie dans les conditions de culture en France, selon le taux de survie locale des tubercules et des baies, en complément à d'autres stratégies culturales visant à minimiser le risque de repousses.

La définition précise de ces mesures, notamment les distances entre parcelles de cultures transgéniques et non transgéniques et la durée des rotations culturales, dépendra des seuils de présence d'ADN transgénique tolérés dans les produits dits « sans OGM ».

6. Plan de surveillance post-commercialisation

En matière de surveillance, le règlement (CE) 1829/03 et la directive 2001/18/CE prévoient que soient mis en place :

1. un plan de surveillance spécifique, pour tester d'éventuelles hypothèses sur des effets négatifs de la plante génétiquement modifiée dans le cadre de son utilisation et de l'évaluation du risque environnemental. Le plan de surveillance spécifique est destiné à mettre en évidence les changements prévisibles.
2. un plan de surveillance générale, pour observer d'éventuels effets non intentionnels ou non anticipés sur la santé humaine et animale ainsi que sur l'environnement. Le plan de surveillance générale vise à mettre en évidence les changements non prévus par les plans de surveillance spécifique.

³⁶ La publication de Skogsmyr (1994) rapporte pour la première fois que des mégilèthes peuvent transporter du pollen de pomme de terre. Les distances de transport publiées dans cet article ont toutefois fait l'objet d'un erratum (Conner and Dale, 1996), pour cause de contamination des échantillons.

6.1 Plan de surveillance générale

Le plan de surveillance générale environnementale proposé par le pétitionnaire est basé sur l'exploitation des réponses aux questionnaires distribués aux utilisateurs de EH92-527-1.

Ce questionnaire porte sur les observations que pourraient faire les utilisateurs (producteurs de plants, agriculteurs, transformateurs) de EH92-527-1, quant aux phénomènes liés au terrain, écosystèmes et espèces présentes habituellement sur les parcelles, en liaison avec les pratiques culturales. Ces utilisateurs sont en effet des observateurs privilégiés pour comparer l'évolution des parcelles transgéniques et conventionnelles qu'ils cultivent.

Une deuxième approche de cette surveillance générale impliquerait des réseaux de biosurveillance privés ou issus du public (le pétitionnaire cite par exemple les associations de producteurs de plants, les instituts d'améliorations des plantes, les écoles d'agronomie ou d'agriculture, les associations d'agriculteurs). Très générales, ces indications devront être précisées dans chaque Etat membre européen autorisant la culture sur son territoire. Le pétitionnaire devrait également s'appuyer sur la synthèse des plans de surveillance proposés par l'association EuropaBio (Garcia-Alonso et al., 2006; Lecoq et al., 2007).

Le pétitionnaire ne prévoit pas que ce plan de surveillance générale s'étende au-delà des parcelles cultivées avec EH92-527-1 ni au-delà de la durée d'autorisation. Il est demandé que, en cas de survenue d'anomalie, le pétitionnaire étende sa surveillance en particulier sous la forme de questionnaires, aux parcelles contiguës aux parcelles plantées en pommes de terre transgéniques, et auprès des producteurs ayant utilisé cette technologie sur une période au moins équivalente à une rotation après la fin de la culture transgénique.

Il est par ailleurs demandé au pétitionnaire de centraliser les données recueillies dans une base centrale de données avec SIG³⁷, si possible connectée avec des bases de données du Centre Commun de Recherche de la Commission européenne.

Aucun plan de surveillance des santés humaine et animale n'est prévu par le pétitionnaire. Il est cependant souhaitable que les animaux qui seront nourris avec les pulpes de pomme de terre issues de la transformation industrielle fassent également l'objet d'un plan de surveillance générale de leur santé. Ce plan de surveillance, d'une durée limitée, pourrait être basé sur l'exploitation des réponses à des questionnaires qui pourraient être distribués aux éleveurs nourrissant les animaux avec les pulpes de pomme de terre EH92-527-1. La pomme de terre EH92-527-1 n'est pas destinée à la consommation humaine ; un plan de surveillance de santé humaine devra être mis en place dans le cas d'une détection de son introduction fortuite dans la chaîne alimentaire humaine.

6.2 Plans de surveillance spécifique

Aucun risque n'ayant été identifié par le pétitionnaire, celui-ci n'a pas prévu de plan de surveillance spécifique en dehors des pratiques culturales habituelles et des questionnaires liés à son système de ségrégation des filières.

6.3 Commentaires et recommandations du CS

La lignée de pomme de terre EH92-527-1 a fait l'objet d'une autorisation de mise en culture pour la transformation industrielle et l'alimentation animale. Elle ne présente *a priori* aucun avantage sélectif. En conséquence il n'y a pas lieu à des pratiques culturales spécifiques autres que celles découlant des mesures de coexistence.

Compte tenu des possibilités de repousses dans les cultures ultérieures, il importe que le producteur utilisant la technologie EH92-527-1 respecte les bonnes pratiques agricoles pour qu'il ne puisse y avoir de persistance de graines génétiquement modifiées dans son champ lors d'une reconversion de ce champ. Un délai minimum à définir devra être observé en cas de cultures de pomme de terre destinées à la consommation humaine. Une information particulière de sensibilisation auprès de ces producteurs devrait être effectuée. De manière

³⁷ Système d'information géographique capable d'organiser et de présenter des données spatialement référencées

générale, les actions relatives à la formation des utilisateurs et l'information doivent être encouragées et poursuivies, de même que la veille scientifique.

Sur le plan méthodologique, l'analyse des données recueillies et des traitements statistiques devra suivre les nouvelles règles d'analyse statistique proposées par l'AESA et la distribution du questionnaire pour la surveillance post-commercialisation devra se référer à la décision communautaire (2009) 7680 du 13 octobre 2009. Le CS du HCB recommande que le pétitionnaire et les autorités compétentes examinent les risques environnementaux potentiels s'il s'avère qu'il existe un taux de réponses aux questionnaires mentionnant des effets indésirables liés à la culture de la pomme de terre EH92-527-1 significatif même si le seuil classique de 5% n'est pas atteint.

Le CS du HCB rappelle au pétitionnaire qu'il est de son devoir, au cours de la période couverte par l'autorisation accordée, d'apporter son concours pour la biosurveillance liée à l'utilisation des biotechnologies qu'il commercialise, quand celui-ci sera sollicité par le CSBT³⁸.

Cette coopération pourrait s'opérer par la mise à disposition des autorités compétentes d'un système de détection immunologique sur feuilles et tubercules de la protéine NPTII et iodométrique sur tubercules afin de faciliter la surveillance du suivi en champ de l'absence d'une dissémination accidentelle de l'événement EH92-527-1 pour les opérateurs ne relevant pas de contrat de production avec le pétitionnaire. Le système de référence UGPase de la pomme de terre devra être amélioré pour éviter les réactions croisées avec d'autres espèces de solanacées en accord avec les critères ENGL CRL-GMFF.

Une certification annuelle de la mise en oeuvre du système de ségrégation devra être effectuée auprès des autorités compétentes avec transmission des rapports au HCB et au CSBT français, de même les résultats des plans de surveillance devront être communiqués annuellement au CSBT et au HCB par un rapport écrit selon le modèle inclus dans la décision 2009/770/CE³⁹.

Le CS souligne que ces plans de surveillance devraient s'étendre au delà de la durée d'autorisation d'importation, transformation et mise en culture et des parcelles de culture de la pomme de terre EH92-527-1 sur une période équivalente à une rotation en cas de survenue d'anomalies.

Au vu du manque de précisions quant aux acteurs des réseaux de surveillance présentés succinctement par le pétitionnaire, il appartient au CSBT de proposer un réseau de biosurveillance du territoire effectif et de définir son champ d'action. Des recommandations générales concernant la biosurveillance des biotechnologies sont portées en annexe 4.

Une centralisation des données recueillies par les questionnaires du système de ségrégation du pétitionnaire avec SIG et connexion avec une base de données du Centre Commun de Recherche de la Commission européenne.

7. Conclusions

Au terme de l'analyse du dossier du pétitionnaire, de l'avis de l'AESA et de données supplémentaires disponibles dans la littérature scientifique, le CS du HCB note que :

- bien que son transfert vers des bactéries soit théoriquement possible, la présence du transgène *nptII* dans la pomme de terre EH92-527-1 ne présente pas de risque singulier pour l'environnement et la santé ;
- aucun effet négatif sur la santé humaine et animale n'a été détecté lors des études de toxicité et d'allergénicité de la protéine NPTII isolée, ni lors des études de toxicité, d'allergénicité et d'alimentarité de la pomme de terre entière EH92-527-1 ou d'un produit

³⁸ Comité de surveillance biologique du territoire CSBT créé par le Décret n° 2008-1282 du 8 décembre 2008, mentionné à l'article L. 251-1 du code rural.

³⁹ La décision n° 2009/770/CE du 13/10/09 établit des formulaires types pour la présentation des résultats de la surveillance relative à la dissémination volontaire dans l'environnement d'organismes génétiquement modifiés, conformément à la directive 2001/18/CE du Parlement européen et du Conseil.

dérivé (pulpe). Toutefois, ces études ne comportent pas de données sur la puissance des tests mis en œuvre, si bien qu'il est impossible d'évaluer le risque qu'un effet biologiquement significatif ne soit pas détecté avec les protocoles adoptés. Ces informations seront exigées à l'avenir, conformément aux nouvelles lignes directrices sur l'analyse statistique de l'AESA (EFSA, 2009b).

Le CS recommande que la culture de pomme de terre EH92-527-1 soit accompagnée de mesures propres à :

- assurer la coexistence entre les filières transgéniques et non transgéniques selon les recommandations qui seront proposées ultérieurement par le HCB ;
- améliorer les plans de surveillance proposés par le pétitionnaire en implémentant les recommandations de l'association Europabio.

8. Bibliographie

Afssa (2004). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché de pommes de terre contenant l'événement EH92-527-1, présentant une composition modifiée en amidon, à des fins de culture et de transformation pour des utilisations non alimentaires et pour l'alimentation animale, au titre de la directive 2001/18/CE. Réponse à la saisine 2004-SA-0188. (Maisons-Alfort).

Afssa (2005a). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché de pommes de terre contenant l'événement EH92-527-1 (AMFLORA) et de ses produits dérivés, présentant une composition modifiée en amidon, pour l'alimentation humaine et animale, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003. Réponse à la saisine 2005-SA-0222. (Maisons-Alfort).

Afssa (2005b). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur les compléments d'information relatifs au dossier d'autorisation de mise sur le marché de pommes de terre contenant l'événement EH92-527-1, présentant une composition modifiée en amidon, à des fins de culture et de transformation pour des utilisations non alimentaires et pour l'alimentation animale, au titre de la directive 2001/18/CE. Réponse à la saisine 2004-SA-0408. (Maisons-Alfort).

Alvarez, M., and Mendoza, M.C. (1992). Epidemiological survey of genes encoding aminoglycoside phosphotransferases APH (3') I and APH (3') II using DNA probes. *J Chemother* 4, 203-210.

Askew, M.F., and Struik, P.C. (2007). The canon of potato science : 20. Volunteer potatoes. *Potato research* 50, 283-287.

Biet, F., Boschioli, M.L., Thorel, M.F., and Guilloteau, L.A. (2005). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res* 36, 411-436.

Broothaerts, W., Corbisier, P., Emons, H., Emteborg, H., Linsinger, T.P.J., and Trapmann, S. (2007). Development of a certified reference material for genetically modified potato with altered starch composition. *J Agric Food Chem* 55, 4728-4734.

CGB (2004). Avis du 25 juin 2004 de la Commission du Génie Biomoléculaire sur le dossier C/SE/96/3501 de demande d'autorisation de mise sur le marché d'une pomme de terre génétiquement modifiée, dont la composition en amidon est modifiée, en vue de sa culture, de son importation et de sa transformation pour des usages non alimentaires et pour l'alimentation animale, dans l'Union Européenne. (Paris, France).

CGB (2005). Avis du 20 janvier 2005 de la Commission du Génie Biomoléculaire sur le dossier C/SE/96/3501 de demande d'autorisation de mise sur le marché d'une pomme de terre génétiquement modifiée, dont la composition en amidon est modifiée, en vue de sa culture, de son importation et de sa transformation pour des usages non alimentaires et pour l'alimentation animale, dans l'Union Européenne. (Paris, France).

Conner, A.J., and Dale, P.J. (1996). Reconsideration of pollen dispersal data from field trials of transgenic potatoes. *Theor Appl Genet* 92, 505-508.

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.

Devaux, I., Kremer, K., Heersma, H., and Van Soolingen, D. (2009). Clusters of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* cases, Europe. *Emerging Infect Dis* 15, 1052-1060.

EC (2010a). Commission decision of 2 March 2010 authorising the placing on the market of feed produced from the genetically modified potato EH92-527-1 (BPS-25271-9) and the adventitious or technically unavoidable presence of the potato in food and other feed products under Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union L53*, 15-18.

EC (2010b). Commission decision of 2 March 2010 concerning the placing on the market, in accordance with Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council, of a potato product (*Solanum tuberosum* L. line EH92-527-1) genetically modified for enhanced content of the amylopectin component of starch. *Official Journal of the European Union L53*, 12-14.

EFSA (2004a). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the Notification (Reference C/DE/02/9) for the placing on the market of insect-protected genetically modified maize MON 863 and MON 863 x MON 810, for import and processing, under Part C of Directive 2001/18/EC from Monsanto. *The EFSA Journal* 49, 1-25.

EFSA (2004b). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the safety of foods and food ingredients derived from insect-protected genetically modified maize MON 863 and MON 863 x MON 810, for which a request for placing on the market was submitted under Article 4 of the Novel Food Regulation (EC) No 258/97 by Monsanto. *The EFSA Journal* 50, 1-25.

EFSA (2004c). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. *The EFSA Journal*, 1-18.

EFSA (2006a). Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. *The EFSA Journal* 99, 1-100.

EFSA (2006b). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the notification (Reference C/SE/96/3501) for the placing on the market of genetically modified potato EH92-527-1 with altered starch composition, for cultivation and production of starch, under Part C of Directive 2001/18/EC from BASF Plant Science. *The EFSA Journal* 323, 1-20.

EFSA (2006c). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application (Reference EFSA-GMO-UK-2005-14) for the placing on the market of genetically modified potato EH92-527-1 with altered starch composition, for production of starch and food/feed uses, under Regulation (EC) No 1829/2003 from BASF Plant Science. *The EFSA Journal* 324, 1-20.

EFSA (2007). Statement of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the safe use of the nptII antibiotic resistance marker gene in genetically modified plants (European Food Safety Authority).

EFSA (2009a). Consolidated presentation of the joint Scientific Opinion of the GMO and BIOHAZ Panels on the "Use of Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants" and the Scientific Opinion of the GMO Panel on "Consequences of the Opinion on the Use of Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants on Previous EFSA Assessments of Individual GM Plants". The EFSA Journal 1108, 1-8.

EFSA (2009b). Scientific opinion on Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs, on request of EFSA. The EFSA Journal 1250, 1-62.

Ellissèche, D. (1996). Aspects physiologiques de la croissance et du développement. In La pomme de terre Production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations, P. Rousselle, Y. Robert, and J.C. Crosnier, eds. (Paris, INRA), pp. 71-121.

EMEA (2007). Presence of the antibiotic resistance marker gene nptII in GM plants for food and feed uses (EMEA/CVMP/56937/2007-Final).

Flannery, M.-L., Meade, C., and Mullins, E. (2005). Employing a composite gene-flow index to numerically quantify a crop's potential for gene flow: an Irish perspective. Environ Biosafety Res 4, 29-43.

Fredrickson, J.K., Bezdicek, D.F., Brockman, F.J., and Li, S.W. (1988). Enumeration of Tn5 mutant bacteria in soil by using a most-probable-number-DNA hybridization procedure and antibiotic resistance. Appl Environ Microbiol 54, 446-453.

Fuchs, R.L., Heeren, R.A., Gustafson, M.E., Rogan, G.J., Bartnicki, D.E., Leimgruber, R.M., Finn, R.F., Hershman, A., and Berberich, S.A. (1993a). Purification and characterization of microbially expressed neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein and its equivalence to the plant expressed protein. Bio-Technology 11, 1537-1542.

Fuchs, R.L., Ream, J.E., Hammond, B.G., Naylor, M.W., Leimgruber, R.M., and Berberich, S.A. (1993b). Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. Bio-Technology 11, 1543-1547.

Garcia-Alonso, M., Jacobs, E., Raybould, A., Nickson, T.E., Sowig, P., Willekens, H., Van der Kouwe, P., Layton, R., Amijee, F., Fuentes, A.M., *et al.* (2006). A tiered system for assessing the risk of genetically modified plants to non-target organisms. Environ Biosafety Res 5, 57-65.

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

Holben, W.E., Jansson, J.K., Chelm, B.K., and Tiedje, J.M. (1988). DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. Appl Environ Microbiol 54, 703-711.

Humblet, M.F., Boschioli, M.L., and Saegerman, C. (2009). Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. Vet Res 40, 24.

ISO (2005a). ISO 21569:2005. Foodstuffs -- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products -- Qualitative nucleic acid based methods (Geneva, Switzerland, International Organization for Standardization).

ISO (2005b). ISO 21570:2005. Foodstuffs -- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products -- Quantitative nucleic acid based methods. (Geneva, Switzerland, International Organization for Standardization).

ISO (2006). ISO 24276:2006. Foodstuffs -- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products -- General requirements and definitions (Geneva, Switzerland, International Organization for Standardization).

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.

Lecoq, E., Holt, K., Janssens, J., Legris, G., Pleysier, A., Tinland, B., and Wandelt, C. (2007). General surveillance: Roles and responsibilities the industry view. *J Verbrauch Lebensm* 2, 25-28.

Love, S.L. (1994). Ecological risk of growing transgenic potatoes in the United States and Canada. *Am Potato J* 71, 647-658.

McPartlan, H.C., and Dale, P.J. (1994). An assessment of gene transfer by pollen from field-grown transgenic potatoes to non-transgenic potatoes and related species. *Transgenic Res* 3, 216-225.

Nair, J., Rouse, D.A., Bai, G.H., and Morris, S.L. (1993). The rpsL gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 10, 521-527.

Petti, C., Meade, C., Downes, M., and Mullins, E. (2007). Facilitating co-existence by tracking gene dispersal in conventional potato systems with microsatellite markers. *Environ Biosafety Res* 6, 223-235.

Pillai, S.D., Josephson, K.L., Bailey, R.L., Gerba, C.P., and Pepper, I.L. (1991). Rapid method for processing soil samples for polymerase chain reaction amplification of specific gene sequences. *Appl Environ Microbiol* 57, 2283-2286.

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 Environ Microbiol* 75, 3314-3322.

Recorbet, G., Picard, C., Normand, P., and Simonet, P. (1993). Kinetics of the persistence of chromosomal DNA from genetically engineered *Escherichia coli* introduced into soil. *Appl Environ Microbiol* 59, 4289-4294.

Riesenfeld, C.S., Goodman, R.M., and Handelsman, J. (2004). Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* 6, 981-989.

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 Environ Microbiol* 74, 1250-1254.

Rossignol, L., and Rousselle-Bourgeois, F. (1996). Botanique, morphologie et taxinomie. In *La pomme de terre Production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations*, P. Rousselle, Y. Robert, and J.C. Crosnier, eds. (Paris, INRA), pp. 49-68.

Rousselle-Bourgeois, F., and Rousselle, P. (1996). Amélioration génétique. In *La pomme de terre Production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations*, P. Rousselle, Y. Robert, and J.C. Crosnier, eds. (Paris, INRA), pp. 125-154.

Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S., and Miller, G.H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 57, 138-163.

Skogsmyr, I. (1994). Gene dispersal from transgenic potatoes to conspecifics: a field trial. *Theor Appl Genet* 88, 770-774.

Smalla, K., Vanoverbeek, L.S., Pukall, R., and Vanelas, J.D. (1993). Prevalence of nptII and Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. *FEMS Microbiol Ecol* 13, 47-58.

Takaoka, M., Teranishi, M., Furukawa, T., Manabe, S., and Goto, N. (1995). Age-related changes in thyroid lesions and function in F344/DuCrj rats. *Exp Anim* 44, 57-62.

Van Kempen, P., Le Corre, P., and Bedin, P. (1996). Phytotechnie. In *La pomme de terre Production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations*, P. Rousselle, Y. Robert, and J.C. Crosnier, eds. (Paris, INRA), pp. 363-412.

Vaucheret, H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev* 20, 759-771.

Vogel, T.M., Simonet, P., Jansson, J.K., Hirsch, P.R., Tiedje, J.M., van Elsas, J.D., Bailey, M.J., Nalin, R., and Philippot, L. (2009). TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. *Nature Reviews Microbiology* 7, 252-252.

Young, J.S., Gormley, E., and Wellington, E.M.H. (2005). Molecular detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur) in soil. *Appl Environ Microbiol* 71, 1946-1952.

Annexe 1 : Saisine



MINISTÈRE DE L'ALIMENTATION, DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE

Courrier reçu le
16 MARS 2010

Direction générale de
l'alimentation

Service de la prévention
des risques sanitaires de
la production primaire

Sous direction de la
qualité et de la protection
des végétaux

Bureau de la
biovigilance, des
biotechnologies et de la
qualité des végétaux

251, rue de Vaugirard
75732 Paris cedex 15

Madame BRECHIGNAC
Présidente du Haut conseil des biotechnologies
à l'attention de Monsieur Hamid Ouahioune
3 place de Fontenoy
75007 PARIS

11 MARS 2010

Paris, le

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

Références : 100301-saisine HCB- dossier pomme de terre culture

Affaire suivie par : Anne Grevet
tél. : 01 49 55 58 25 fax : 01 49 55 59 49
courriel : anne.grevet@agriculture.gouv.fr

PJ : sous format électronique:

- dossier C/ES/36/01 déposé par BASF dans le cadre de la directive 2001/18/CE auprès des autorités suédoises en 2003 pour la culture et la transformation industrielle, et informations complémentaires apportées au cours de la procédure à la demande des Etats membres et de l'AESA
- avis rendus par l'AESA (7/12/05), par l'AFSSA (22/06/04 et 24/01/05) et par la Commission du génie biomoléculaire (25/06/04 et 20/01/05)
- dossier EFSA/GMO/UK/2005/14 déposé par BASF auprès de l'AESA en 2005 dans le cadre du règlement 1829/2003 pour l'alimentation animale et informations complémentaires apportées au cours de la procédure à la demande de l'AESA.
- avis rendus par l'AESA (7/12/05) et par l'AFSSA (16/09/05)
- avis rendu par l'AESA en 2009

Madame la Présidente,

Le dossier C/SE/96/3501 relatif à la mise sur le marché de la pomme de terre génétiquement modifiée EH92-527-1 pour la culture et la transformation industrielle a été déposé auprès des autorités suédoises dans le cadre de la directive 2001/18/CE.

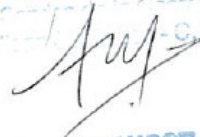
Par ailleurs, un dossier relatif à l'utilisation en alimentation animale a été déposé dans le cadre du règlement 1829/2003 (EFSA/GMO/UK/2005/14).

La Commission européenne vient d'adopter deux décisions d'autorisation pour cet OGM, l'une pour la culture et la transformation industrielle, l'autre pour l'utilisation de sous-produits en alimentation animale.

La pomme de terre génétiquement modifiée EH92-527-1 est une pomme de terre dont l'amidon est enrichi en amylopectine. Elle est destinée à la production d'amidon pour des usages industriels tels que la pâte à papier. Les sous-produits de la production d'amidon, tels que les pulpes, pourront être utilisés en alimentation animale. Il est prévu que cette pomme de terre soit produite sous contrat avec un dispositif d'identité préservée.

Suite à l'autorisation de la culture de cet OGM, et en tenant compte des différents avis rendus par ailleurs et joints à ce courrier, j'ai l'honneur de vous demander, par la présente saisine, de bien vouloir procéder à une analyse de l'avis de l'AESA et du dossier du pétitionnaire, notamment en ce qui concerne le gène de résistance à un antibiotique et les possibilités de transfert de gènes vers l'environnement. Il est également demandé au Haut Conseil des biotechnologies de proposer les conditions techniques qui pourraient être mises en œuvre dans le cadre de la coexistence avec les cultures de pomme de terre conventionnelle.

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

Le Directeur Général Adjoint
Chef du Centre de Coordination
des Activités - C.V.O.

Jean-Luc ANGOT

Annexe 2 : Elaboration de l'avis

L'avis a été élaboré par le CS du HCB, composé de :

Jean-Christophe Pagès, Président, Jean-Jacques Leguay, Vice-Président,

et par ordre alphabétique des noms de famille : Yves Bertheau, Pascal Boireau, Denis Bourguet, Florence Coignard, François-Christophe Coléno, Jean-Luc Darlix, Elie Dassa, Maryse Deguergue, Hubert de Verneuil, Robert Drillien, Anne Dubart-Kupperchmitt, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Mireille Jacquemond, André Jestin, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Jane Lecomte, Olivier Le Gall, Yvon Le Maho, Didier Lereclus, Patrice Mannoni, Rémy Maximilien, Antoine Messéan, Bertrand Ney, Jacques Pagès, Daniel Parzy, Catherine Regnault-Roger, Pierre Rougé, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Virginie Tournay.

Aucun membre du CS n'a déclaré avoir de conflits d'intérêts qui auraient pu interférer avec son analyse du dossier.

Les rapporteurs extérieurs, Jean-Eric Chauvin (INRA), Thierry Lambert (Université de Paris-Sud-XI) et Réjane Mazier (GIPT), ont été sollicités pour compléter l'expertise du CS. Ils ont signé un engagement de confidentialité, et ont certifié leur absence de conflits d'intérêts après avoir pris connaissance du dossier. Jean-Eric Chauvin et Thierry Lambert ont fourni une analyse du dossier dans leur domaine d'expertise, et ont été auditionnés par le CS. Réjane Mazier a apporté un éclairage sur la filière économique et industrielle de la pomme de terre en France. Aucun des rapporteurs extérieurs n'ont directement contribué à la rédaction de l'avis du CS.

Annexe 3 : Analyse de l'avis de l'AESA

Analyse de l'avis de l'AESA sur l'impact de la pomme de terre EH92-527-1 sur l'environnement

L'AESA a rendu en 2006 un avis sur la culture de la pomme de terre EH92-527-1 (EFSA, 2006b), qui est globalement en accord avec les conclusions de cet avis :

- la transformation génétique ne confère pas à la pomme de terre EH92-527-1 un avantage sélectif lui permettant d'être plus adaptée à la survie en conditions naturelles que le témoin non transgénique Prevalent ;
- les risques de transfert des transgènes (nptII ou gbss) vers des microorganismes sont très faibles et les transferts éventuels ne présenteraient pas un danger accru, ni pour l'environnement, ni pour la santé animale ou humaine, les gènes étant déjà présents dans les communautés microbiennes ;
- les possibilités de diffusion par le pollen et/ou la graine vers des espèces apparentées est extrêmement faible sous nos conditions et n'aurait de toute façon aucune incidence sur l'environnement ;
- les expérimentations conduites en Europe du Nord montre qu'il n'y a pas de différence de comportement de la pomme de terre EH92-527-1 vis-à-vis d'autres organismes (insectes, nématodes, bactéries, champignons, virus). L'absence de données dans les pays d'Europe du Sud ne pose pas de problème majeur, les pays concernés par la production de féculé étant principalement l'Allemagne, la France, le Danemark et les Pays-Bas ;
- une surveillance générale des sites où la culture sera déployée devrait suffire à noter d'éventuels effets non suspectés ;
- la biodégradation de la plante, de ses organes ou de ses résidus ne pose pas de problème particulier au niveau des communautés microbiennes, même si celles-ci seront probablement modifiées par le changement de composition de l'amidon ;
- la culture de pomme de terre féculière étant une culture sous contrat, les zones de culture seront clairement délimitées et donc faciles à surveiller.

Analyse de l'avis de l'AESA concernant les risques sanitaires associés au transgène nptII

Le 2 avril 2004, le Panel OGM de l'AESA a émis une opinion "on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants (EFSA, 2004c).

En mars 2007, l'AESA a publié un "statement on the safe use of the nptII antibiotic resistance marker gene and the GM plant already placed on the market within the european union" (EFSA, 2007).

Suite à une demande de la Commission européenne adressée à l'Autorité de sécurité des aliments (AESA), le groupe scientifique sur les organismes génétiquement modifiés (GMO) et le groupe scientifique sur les risques biologiques (BIOHAZ) ont été invités à rendre un avis scientifique commun sur l'utilisation de gènes de résistance aux antibiotiques comme gènes marqueurs dans des plantes génétiquement modifiées (EFSA, 2009a). À partir de l'ensemble des preuves recueillies, les deux groupes scientifiques ont tiré les conclusions suivantes :

« Il n'a pas été montré qu'un transfert de gènes marqueurs de résistance aux antibiotiques à partir de plantes (GM) vers des bactéries avait eu lieu, que ce soit dans des conditions naturelles ou en laboratoire, en l'absence de séquence d'ADN identique dans la cellule bactérienne hôte. Une séquence d'ADN identique est nécessaire pour permettre une recombinaison homologue entre l'ADN transformé dans la plante et l'ADN bactérien. Le

transfert d'ADN depuis des plantes GM vers des bactéries, pour autant qu'il se produise, est considéré comme étant peu fréquent, comparé au transfert de gènes entre bactéries ».

L'AESA a par ailleurs publié le 11 juin 2009 une déclaration relative aux risques liés à la présence de gènes de résistance à des antibiotiques dans les PGM comportant 1) un avis scientifique commun des groupes GMO et BIOHAZ, 2) un avis scientifique distinct du groupe GMO, 3) une lettre de l'AESA adressée aux présidents du comité scientifique et des 2 groupes, 4) une réponse des présidents (Questions EFSA-Q-2008-04977 , EFSA-Q-2008-411 , EFSA-Q-2009-00589 , EFSA-Q-2009-00593).

Avis de l'AESA après les avis de l'OMS et de l'EMEA :

L'OMS en 2005 et l'EMEA en 2007 ont estimé que la kanamycine et la néomycine avaient une importance thérapeutique notable, principalement en raison de leur utilisation en médecine vétérinaire (EMEA, 2007). Ces avis n'ont pas été approuvés par l'AESA qui a jugé *npII* sans conséquence sanitaire du fait de sa distribution ubiquiste et de la place en médecine humaine des antibiotiques concernés.

Analyse approfondie de l'avis de l'AESA concernant le risque de transfert horizontal de *npII*

Analyse de l'avis paru dans *The EFSA Journal* (2006) 323, 1-20 (EFSA, 2006b) : Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the notification (Reference C/SE/96/3501) for the placing on the market of genetically modified potato EH92-527-1 with altered starch composition, for cultivation and production of starch, under Part C of Directive 2001/18/EC from BASF Plant Science (Question No EFSA-Q-2005-023)

repris quasi à l'identique dans *The EFSA Journal* (2006) 324, 1-20 (EFSA, 2006c) : Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application (Reference EFSA-GMO-UK-2005-14) for the placing on the market of genetically modified potato EH92-527-1 with altered starch composition, for production of starch and food/feed uses, under Regulation (EC) No 1829/2003 from BASF Plant Science (Question No EFSA-Q-2005-070)

L'avis indique que le taux élevé de dégradation de l'ADN végétal après sa libération dans le sol réduisait très fortement les possibilités de transfert à partir de la plante transgénique vers les bactéries, ce qui est tout à fait exact. Il faut toutefois préciser qu'une fraction significative et détectable de l'ADN végétal persiste plusieurs mois dans le sol et y conserve un potentiel biologique (limite atteinte : 2 années). D'autre part, le transfert d'ADN n'est pas limité à l'environnement « sol » mais peut aussi se réaliser *in planta* lors de l'infection de la plante par des pathogènes qui créent des voies d'entrée pour d'autres microorganismes saprophytes du sol. Il convient de rester très prudent concernant les fréquences de transfert d'ADN entre plantes et bactéries car les estimations sont par trop imprécises et incomplètes pour permettre des estimations correctes.

L'avis indique que par ailleurs, l'impact de tels événements serait insignifiant considérant la forte occurrence dans le sol de bactéries présentant naturellement la résistance à ces antibiotiques. Le gène *npII* est un gène marqueur très souvent utilisé sans qu'aucun problème n'ait jamais été signalé. En conclusion, le transfert du gène *npII* de la plante vers les bactéries semble très improbable, et de toute façon, il n'établirait pas de nouvelles fonctions au sein de la communauté bactérienne, ce qui permet de conclure que cette plante ne présente a priori aucun risque pour la santé de l'homme ou de l'animal ou sur l'environnement.

Analyse du "STATEMENT OF EFSA (EFSA, 2009a) sur l'impact des gènes de résistance à des antibiotiques utilisés dans les plantes génétiquement modifiées

Consolidated presentation of the joint Scientific Opinion of the GMO and BIOHAZ Panels on the "Use of Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants" and the Scientific Opinion of the GMO Panel on "Consequences of the Opinion on the Use of

Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants on Previous EFSA Assessments of Individual GM Plants” (Questions EFSA-Q-2009-00589 and EFSA-Q-2009-00593)

Suite à une demande de l'AESA, le groupe GMO et celui nommé BIOHAZ (Biological Hazards) ont été saisis pour exprimer une opinion scientifique commune à propos de l'utilisation des gènes de résistance à des antibiotiques comme gènes marqueurs dans les plantes génétiquement modifiées (OGM).

Les travaux se sont concentrés sur les deux gènes marqueurs de plantes soumises pour autorisation à l'EFSA, le gène (*aph(3')*-IIa = *nptII* conférant la résistance à la kanamycine et à la néomycine) et le gène *ant-(3'')*-Ia = *aadA* qui confère la résistance à la streptomycine et à la spectinomycine.

Les principales conclusions des travaux des deux groupes sont les suivantes :

- *Le transfert des gènes de résistance à des antibiotiques des plantes aux bactéries n'a pas été détecté soit en conditions naturelles soit au laboratoire en l'absence de séquences de forte similarité entre le transgène et le génome de la bactérie réceptrice. Cette forte similarité de séquences est nécessaire pour amorcer la recombinaison homologue entre l'ADN transformant provenant de la plante et l'ADN du génome bactérien récepteur. C'est totalement exact, les recombinaisons illégitimes se réalisent à des fréquences plusieurs ordres de grandeur inférieures qui les rendent difficilement détectables notamment *in situ*.*
- *Le transfert d'ADN à partir des plantes génétiquement modifiées aux bactéries, s'il se passe effectivement, est considéré se réaliser à des fréquences très faibles en comparaison du transfert de gènes entre bactéries. Cette conclusion est tout à fait exacte, considérant que les échanges entre bactéries se réalisent par différents mécanismes (transformation, conjugaison, transduction) tandis que le transfert à partir des plantes ne peut relever que d'un événement de transformation. Toutefois, les outils disponibles actuellement la diversité bactérienne très importante dans le sol, la proportion très élevée de bactéries non cultivables et la complexité physique et chimique de la matrice tellurique ne permettent pas de préciser à quelles fréquences le transfert des gènes marqueurs entre plantes GM et bactéries environnementales peut effectivement se réaliser.*
- *Des études récentes basées sur les approches métagénomiques ont montré que des déterminants génétiques conférant la résistance à la kanamycine, la néomycine et la streptomycine sont présents dans tous les environnements étudiés. De tels gènes de résistance font partie d'un très important réservoir à partir duquel les gènes peuvent être disséminés entre les bactéries. En fait, les études métagénomiques n'ont fait que confirmer des études plus classiques sur l'occurrence importante de ces gènes de résistance dans les différents environnements. Très clairement, les échanges de gènes se réalisent entre bactéries à des fréquences significatives et bien supérieures à celles entre plantes GM et bactéries.*
- *Ces gènes « marqueurs » ont une origine bactérienne et sont détectés à des fréquences différentes selon les espèces, les isolats et les environnements. Toutefois, la relation spatio-temporelle entre la prévalence de la résistance bactérienne et la pression de sélection n'est pas totalement élucidée. Tout à fait exact, pas de commentaire supplémentaire.*
- *La concentration des antibiotiques dans les différents environnements ainsi que l'utilisation de ces molécules sont des facteurs clé conditionnant la sélection et la dissémination des gènes de résistance à des antibiotiques. C'est tout à fait exact, la modification de la structure des communautés bactériennes dans des environnements ayant subi une contamination par des antibiotiques a été largement démontrée. Ce problème est beaucoup plus important que celui lié aux plantes GM mais est beaucoup moins médiatisé.*
- *La kanamycine et la néomycine sont deux antibiotiques classés comme hautement importants, la kanamycine étant notamment utilisée pour le traitement de la tuberculose quand celle-ci est due à des souches multi-résistantes. Pas de commentaires supplémentaires.*

- *En dépit de quelques points restant à éclaircir, notamment sur la relation entre exposition aux antibiotiques et potentialités de dispersion des gènes de résistance, l'état actuel des connaissances permet de conclure qu'un impact négatif lié au transfert du gène marqueur nptII (comme celui du gène aadA) à partir des plantes GM vers les bactéries est très improbable.*

Ces conclusions ont pu être proposées suite à la rédaction d'une synthèse bibliographique extrêmement détaillée qui est présentée en annexe 1 de l'avis.

Les auteurs y présentent les approches tant expérimentales qu'*in silico* utilisées pour étudier le transfert entre plantes transgéniques et bactéries, et mettent en parallèle ces résultats avec ceux concernant le transfert, entre bactéries, des déterminants génétiques conférant la résistance à des antibiotiques. Ces données sont suivies d'une revue sur l'effet de la pression de sélection sur la dissémination des déterminants génétiques et l'influence sur la valeur adaptative des bactéries que représente la présence de ces gènes au sein de leur génome.

Une partie importante de cette synthèse bibliographique est consacrée à la distribution et l'abondance des bactéries résistantes à des antibiotiques dans l'environnement naturel mais aussi dans l'alimentation humaine et animale. Quoique très détaillée, cette analyse n'est cependant pas totalement exhaustive puisque les auteurs ont omis de prendre en compte les travaux sur l'occurrence limitée du gène *nptII* dans les génomes des bactéries telluriques.

Un autre point abordé par cette synthèse concerne les antibiotiques eux-mêmes, l'usage qui en est fait tant en médecine humaine que vétérinaire et l'importance de ces données pour l'évaluation du risque.

Cette évaluation du risque lié à la présence de ces gènes marqueurs dans le génome des plantes transgéniques fait enfin l'objet d'une étude spécifique présentée dans un paragraphe séparé et qui permet au lecteur d'avoir tous les éléments scientifiques pris en compte pour tirer les conclusions sur l'estimation du risque.

Les différents éléments présentés dans cette intéressante étude bibliographique justifient totalement les conclusions émises précédemment sur le risque négligeable que fait courir pour la santé humaine ou animale comme pour l'environnement la présence de ces gènes de résistance à des antibiotiques (*nptII* et *aadA*) dans les plantes GM.

Annexe 4 : Recommandations en matière de biosurveillance

Pour l'élaboration du plan de surveillance par le Comité de Surveillance Biologique du Territoire, le CS du HCB recommande les points suivants :

- instaurer des plans de surveillance des parcelles de cultures transgéniques et des parcelles contiguës de durée plus longue que la seule durée d'autorisation en cas de survenue d'anomalie ;
- définir l'éventail des espèces à surveiller dans le cadre d'une biosurveillance nationale ;
- susciter des programmes de recherche dédiés à des préoccupations mises en avant par l'actualité (ex : incidence sur de nouvelles espèces invasives) ou par les questions des Etats membres de l'Union Européenne ;
- créer une base centralisée de données avec SIG sur les plantes génétiquement modifiées, et veille bibliographique, le tout étant interconnecté et interfacé avec d'autres bases de données nationales et européennes sur les pratiques agricoles, en particulier avec celles du Centre Commun de Recherche ;
- améliorer la transparence des plans de surveillance par la publication en ligne des résultats non confidentiels.