

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 19 juin 2017

AVIS

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

relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003, du colza génétiquement modifié MS11, développé pour être tolérant au glufosinate-ammonium et mâle stérile, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-BE-2016-138)

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 13 mars 2017 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003, du colza génétiquement modifié MS11, développé pour être tolérant au glufosinate-ammonium et mâle stérile, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-BE-2016-138).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Conformément au Règlement (CE) n° 1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) est chargée de procéder à l'évaluation des dossiers concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux issus de plantes génétiquement modifiées et de rendre un avis à la Commission européenne. L'EFSA a cependant offert la possibilité aux États membres de faire connaître leurs observations sur les dossiers initiaux. C'est dans ce cadre que la DGCCRF a sollicité l'avis de l'Anses.

Le Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 s'applique pour ce dossier.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X50-110 « Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été réalisée par le Groupe de Travail (GT) « Biotechnologie », réuni le 16 mars, le 20 avril et le 18 mai 2017. Elle a été menée sur la base de rapports initiaux rédigés par cinq rapporteurs et en se fondant sur les lignes directrices du Panel GMO de l'EFSA (2006, 2011) et sur les éléments complémentaires jugés nécessaires par les experts du GT « Biotechnologie ».

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GROUPE DE TRAVAIL

Les sections, telles que définies dans le formulaire de commentaires de l'EFSA, sont reprises ci-dessous.

PARTIE I - INFORMATIONS GÉNÉRALES

Le colza (*Brassica napus*) est une brassicacée annuelle à fleurs jaunes issue du croisement naturel entre un chou (*B. oleracea*) et une navette (*B. rapa*). Les principaux pays producteurs de colza sont le Canada, la Chine, l'Inde, l'Allemagne, la France, l'Australie et la Pologne, qui représentent plus de 75 % de la production mondiale. En 2014, cette production était de 73 800 810 tonnes (dont 28 769 012 tonnes pour une surface récoltée de 9 112 992 hectares dans l'Union européenne, FAOSTAT¹) et 25 % du colza cultivé était génétiquement modifié (James, 2014).

Le colza est, avec le tournesol et l'olive, l'une des principales plantes à huile produites en Europe. L'huile de colza est utilisée pour l'alimentation humaine et pour la production de biocarburants. Le tourteau de colza (coproduit de l'extraction de l'huile) est utilisé en alimentation animale, mais il est beaucoup moins énergétique que le tourteau de soja. A l'heure actuelle, toutes les variétés de colza destinées à l'alimentation humaine sont dépourvues d'acide érucique et pauvres en glucosinolates (variétés dites "double zéro").

Le colza MS11 a été génétiquement modifié afin d'introduire dans son génome les cassettes d'expression des gènes *barnase* (stérilité mâle), *barstar* (restauration de la fertilité) et *bar* (tolérance au glufosinate-ammonium). Ce dossier correspond à une première demande d'autorisation de mise sur le marché pour l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de ce colza. Il ne concerne pas sa mise en culture. Il convient de rappeler que si des colzas tolérants à un (des) herbicide(s) venaient à être importés, ils devraient satisfaire à la réglementation européenne relative aux limites maximales de résidus de produits phytosanitaires.

PARTIE II - INFORMATIONS SCIENTIFIQUES

II.1. Identification et caractérisation des dangers

II.1.1. Informations concernant les plantes réceptrices ou (le cas échéant) parentales

La transformation génétique a été réalisée sur la variété N90-740. Différentes générations de croisements avec N90-740 (T₁ à T₅) ont été produites à partir de la plante initiale transformée (T₀), ainsi qu'une F₁ issue du croisement de la T₂ avec la variété Ebony et une F₁ issue du croisement de la T₂ avec la variété B144. Enfin, des générations BC ont été produites par backcross de la F₁ avec le parent récurrent : BC₁ et BC₂ dans le cas du croisement avec la variété Ebony et BC₁ à BC₅ dans le cas du croisement avec la variété B144. Les plantes de la génération T₀ ont été sélectionnées sur la tolérance au glufosinate-ammonium.

¹ <http://faostat3.fao.org/home/F>

II.1.2. Caractérisation moléculaire

II.1.2.1. Informations concernant la modification génétique

La transformation génétique a été réalisée avec la souche C58C1^{Rif} d'*Agrobacterium tumefaciens* sur des cals embryogènes obtenus à partir de cals issus de la dédifférenciation de cellules d'hypocotyles. Le plasmide pTCO113 utilisé pour la transformation porte les cassettes d'expression des trois gènes d'intérêt, *barnase*, *barstar* et *bar*, entre les bordures droite et gauche de l'ADN-T. Il contient également, à l'extérieur de l'ADN-T, le gène *barstar* inséré dans le gène de l'aminoglycoside-adényltransférase (*aadA*) d'*Escherichia coli*. La souche d'*A. tumefaciens* utilisée pour la transformation contenait ce plasmide ainsi que le plasmide auxiliaire (helper) pGV4000, qui porte les gènes de virulence nécessaires pour le transfert de l'ADN-T dans le génome de la plante.

L'ADN-T inséré dans le génome du colza MS11 contient les cassettes d'expression des gènes *barnase*, *barstar* et *bar*, dont les caractéristiques sont les suivantes :

- 1) la cassette codant la protéine Barnase comprend la séquence codante du gène *barnase* placée sous le contrôle du promoteur du gène TA29 du tabac (Pta29), qui permet une expression uniquement au niveau du tapetum des anthères. Le terminateur est composé de la région 3'UTR du gène *barnase* (3'*barnase*) et de la région 3'UTR du gène de la nopaline synthase de l'ADN-T du plasmide pTiT37 (3'*nos*) ;
- 2) la cassette codant la protéine Barstar comprend la séquence codante du gène *barstar* placée sous le contrôle de la région promotrice du gène de la nopaline synthase d'*A. tumefaciens* (Pnos) et de la région 3'UTR du gène 7 de l'ADN-TL du plasmide Ti à octopine d'*A. tumefaciens* (3'*g7*) ;
- 3) la cassette codant la protéine PAT comprend la séquence codante du gène *bar* placée sous le contrôle du promoteur du gène codant la petite sous unité de la RUBISCO d'*Arabidopsis thaliana* (PssuAt) et du terminateur 3'*g7*. Le promoteur PssuAt est actif dans tous les tissus verts de la plante.

Les gènes *barnase* et *barstar* proviennent de *Bacillus amyloliquefaciens*. Ils codent respectivement la protéine Barnase, qui a une activité ribonucléasique, et la protéine Barstar, qui est un inhibiteur spécifique de Barnase. L'expression du gène *barnase* dans le tapetum des anthères conduit à la production de fleurs mâles stériles (absence de pollen viable dans les anthères). Le pétitionnaire mentionne à plusieurs reprises que l'expression du gène *barstar* en plus de celle du gène *barnase* permet d'obtenir une meilleure efficacité de transformation que lorsque le gène *barnase* est exprimé seul. Cependant, il ne présente pas dans le dossier la démonstration que le colza MS11 est effectivement mâle stérile.

Le gène *bar*, issu de *Streptomyces hygroscopicus*, code l'enzyme PAT (phosphinothricine-N-acétyltransférase), qui confère à la plante la tolérance au glufosinate-ammonium.

II.1.2.2. Informations concernant la plante génétiquement modifiée

L'analyse moléculaire du colza MS11 repose sur des analyses de type Southern blot et sur l'amplification par PCR et le séquençage de l'insert (5778 pb) et des régions flanquantes en 5' et en 3' de l'insert (1129 et 1302 pb, respectivement). Les analyses de type Southern blot ont été menées sur la génération T₂. Le témoin non génétiquement modifié utilisé est à juste titre la variété N90-740. Il en est de même pour le séquençage de l'insert et des régions flanquantes en 5' et en 3' de l'insert, ainsi que pour la recherche de séquences issues du vecteur plasmidique. L'analyse de l'expression des protéines Barnase, Barstar et PAT a été réalisée sur la génération T₄. Le témoin négatif utilisé est à juste titre la variété N90-740. L'analyse de la stabilité structurelle des séquences insérées a été menée sur les générations T₂, T₃, F₁ (Ebony), BC₁ (Ebony) et BC₂ (Ebony), en utilisant à juste titre la variété N90-740 comme témoin non génétiquement modifié. Enfin, l'héritabilité de l'insert a été analysée par PCR sur les générations T₃, T₄, T₅, BC₄ (B144) et BC₅ (B144).

Les résultats montrent :

- une insertion unique de l'ADN-T ;
- l'identité d'organisation et de séquence de l'ADN-T inséré dans le génome du colza MS11 avec celles de l'ADN-T présent dans le vecteur pTCO113 ;
- une délétion de 40 pb dans le génome de la plante au site d'insertion ;
- l'absence de séquences issues du vecteur plasmidique.

Les analyses bioinformatiques ne mettent pas en évidence de cadre ouvert de lecture (ORF) putatif, sur l'ADN-T et au niveau des jonctions, présentant des homologies de séquence avec des gènes codant une toxine ou un allergène connu. En revanche, elles révèlent la présence d'un ORF à proximité du site d'insertion, dans la séquence flanquante en 3' de l'insert. L'ADN-T n'a pas interrompu cet ORF, mais il pourrait en revanche en modifier l'expression. Afin de lever ce doute, il serait utile que le pétitionnaire réalise une étude de la transcription de cette région sur les colzas MS11 et N90-740.

Les teneurs des protéines Barnase, Barstar et PAT dans différents tissus (plantes entières, racines, inflorescences et graines) prélevés à différents stades de développement de la plante ont été mesurées à l'aide de tests ELISA. Les plantes ont été cultivées sur 3 sites au Canada et aux USA en 2014, avec et sans traitement avec du glufosinate-ammonium (T et NT, respectivement). La teneur en protéine Barnase est inférieure à la limite de quantification de la méthode de mesure dans tous les tissus analysés. La teneur en protéine Barstar est quantifiable dans les racines du colza MS11, NT et T, aux stades montaison et début de la floraison. Elle l'est également dans la plante entière et dans les inflorescences du colza MS11 T au stade début de la floraison. En revanche, la teneur en protéine Barstar est inférieure à la limite de quantification de la méthode de mesure dans tous les autres tissus analysés, notamment les graines au stade mature. Enfin, la protéine PAT est quantifiable dans tous les tissus analysés, à l'exception d'une partie des échantillons de racines du colza MS11 NT au stade début de la floraison. Dans les graines au stade mature, la teneur en protéine PAT est de $0,30 \pm 0,17$ et $0,44 \pm 0,18$ $\mu\text{g/g}$ de matière fraîche pour le colza MS11 NT et T, respectivement.

Une analyse de ségrégation a été réalisée. Elle permet de conclure que l'insertion est stable, unique et à hérédité mendélienne.

II.1.2.4. Conclusions de la caractérisation moléculaire

Les éléments présentés dans le dossier concernant la caractérisation moléculaire du colza MS11 permettent de caractériser ce colza et ne sont pas évocateurs d'un risque lié à son utilisation en alimentation animale ou humaine. Toutefois, ils ne montrent pas que ce colza est mâle stérile. Par ailleurs, il serait utile que le pétitionnaire réalise une étude de la transcription de la région située en 3' de l'insert, afin de vérifier si l'expression de l'ORF qui s'y trouve est modifiée suite à l'insertion de l'ADN-T.

II.1.3. Evaluation comparative

II.1.3.1. Choix de l'équivalent non transgénique et des comparateurs supplémentaires

Le colza MS11 est comparé à juste titre avec la variété témoin N90-740, ainsi qu'avec 6 variétés commerciales de référence choisies pour représenter la variabilité génétique, phénotypique, agronomique et de composition chimique des variétés de colza cultivées en Amérique du Nord.

II.1.3.2. Dispositif expérimental et analyse statistique des données issues des essais au champ pour l'analyse comparative

Le colza MS11, la variété témoin et les variétés commerciales (3 variétés par site) ont initialement été cultivés sur 10 sites aux USA et au Canada en 2014. L'un des sites a ensuite été écarté des analyses, suite à des problèmes climatiques (pluies excessives en début de culture) qui ont compromis la réussite de cet essai.

Sur chaque site, le colza MS11 a été cultivé avec ou sans traitement herbicide avec du glufosinate-ammonium (respectivement T et NT). Chaque modalité (variété témoin, variétés commerciales et variété génétiquement modifiée T et NT) a été répétée quatre fois sur chaque site selon un plan d'expérience en blocs randomisés. Les caractéristiques de ce plan d'expérience respectent les recommandations du Panel GMO de l'EFSA (2011).

L'hybride MS11 x RF3, traité ou non avec du glufosinate-ammonium, a également été cultivé sur chaque site.

Les caractéristiques agronomiques, phénotypiques et de composition sont comparées à l'aide d'analyses de variance (ANOVA) en regroupant les résultats des 9 sites expérimentaux retenus pour les analyses. Les ANOVA sont réalisées avec un modèle linéaire à effets mixtes incluant :

- un effet fixe "génotype", indiquant s'il s'agit du colza MS11 NT ou T, de la variété témoin ou des variétés commerciales ;
- des effets aléatoires : "site", "bloc dans le site" et "variété commerciale".

Les données brutes sous format électronique et les programmes de calcul sont fournis. Le pétitionnaire présente également une analyse des interactions entre les génotypes et les sites.

Le modèle statistique utilisé, qui inclut un effet fixe "génotype" et un effet aléatoire "variété commerciale", correspond à celui proposé par le Panel GMO de l'EFSA (2011).

Le colza MS11 est comparé à la variété témoin par des tests de différence et aux variétés commerciales par des tests d'équivalence. Les erreurs de type 1 retenues par le pétitionnaire sont de 10 % pour les tests de différence et de 5 % pour les tests d'équivalence. Les résultats des tests statistiques sont interprétés selon l'approche décrite par le Panel GMO de l'EFSA (2010), en classant les variables en 4 catégories selon les résultats du test d'équivalence et 7 types après combinaison avec les résultats des tests de différence.

II.1.3.3. Sélection du matériel et des composés pour analyse

L'analyse de composition porte uniquement sur la graine crue. Les composés analysés correspondent à ceux du document consensus de l'OCDE (2011).

II.1.3.4. Analyse comparative de la composition

Les mesures de 57 composés parmi les 93 analysés sont utilisables pour les analyses statistiques. L'analyse combinée de l'ensemble des sites d'expérimentation montre que le colza MS11 NT diffère de son témoin isogénique pour les teneurs en protéines, histidine, lysine, acides palmitique, palmitoléique, stéarique, linoléique, arachidique, béhénique et lignocérique, ainsi que pour les teneurs en potassium, gluconapine et tannins insolubles. Le colza MS11 T diffère de son témoin isogénique pour tous les composés analysés, à l'exception de l'acide aspartique, du cuivre, du fer, du manganèse, du zinc, de l'alpha-tocophérol, du 4-hydroxy- glucobrassicine, de la sinapine, des tannins insolubles et des tannins totaux. Selon le pétitionnaire, le fait que les différences soient plus nombreuses pour le colza MS11 T que pour le colza MS11 NT est lié au fait que le traitement herbicide avec du glufosinate-ammonium élimine les ségréants fertiles du colza MS11. De même que dans le volet moléculaire du dossier concernant la stérilité effective du colza MS11, les éléments fournis par le pétitionnaire sont insuffisants pour s'assurer de la validité de cette explication.

Parmi les composés pour lesquels des différences significatives sont observées :

- deux (cuivre et acide aspartique) sont classés dans le type 5 (non-différent et plutôt non-équivalent) pour le colza MS11 NT ;
- deux (matières grasses et magnésium) sont classés dans le type 6 (différent et plutôt non-équivalent) et trois (cuivre, zinc et acide aspartique) sont classés dans le type 7 (différent et non-équivalent) pour le colza MS11 T.

Toutefois, les valeurs moyennes mesurées pour ces paramètres sur le colza MS11 sont toujours comprises dans l'intervalle des valeurs mesurées sur les variétés commerciales, celles fournies par l'OCDE (2011) et celles de la base de données de l'ILSI (2014)².

II.1.3.5. Analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques

Les caractéristiques agronomiques et phénotypiques ont été évaluées sur 7 paramètres pour lesquels le colza MS11 NT ne se différencie pas de son témoin isogénique. En revanche, le colza MS11 T est différent du témoin isogénique sur le nombre de jours nécessaires pour atteindre la floraison ($44,0 \pm 4,10$ versus $43,5 \pm 4,07$ jours) et la maturité ($105,9 \pm 11,71$ versus $100,5 \pm 10,11$ jours), le rendement en grains ($1\ 333,5 \pm 793$ versus $1\ 638,0 \pm 959,5$ kg/ha) et la vigueur des plantules (note de $7,53 \pm 1,71$ versus $6,83 \pm 1,65$). Toutefois, le colza MS11, NT et T, est équivalent aux variétés commerciales pour tous les paramètres mesurés. L'évaluation de la réponse à des stress abiotiques, des maladies ou des insectes ravageurs a été réalisée 4 fois en cours de culture sur chaque site et elle n'a pas mis en évidence de différence entre le colza MS11, NT et T, et son témoin isogénique. Le colza MS11 apparaît donc équivalent aux variétés commerciales sur le plan agronomique et phénotypique, à l'exception de la tolérance au glufosinate-ammonium.

II.1.3.6. Effets de la transformation

Les principaux produits obtenus à partir des graines de colza sont l'huile et le tourteau. A partir de la récolte d'un site, le pétitionnaire a réalisé une analyse comparative de composition entre le colza MS11 T et son témoin isogénique pour les graines crues, le tourteau pressé, le tourteau déshuilé, le tourteau toasté et l'huile brute et raffinée. Les compositions sont similaires entre le colza MS11 T et son témoin isogénique, à l'exception des teneurs en protéines et en glucosinates totaux du tourteau toasté ($49,1 \pm 0,4$ versus $47,3 \pm 0,4$ % de la matière sèche et $5,7 \pm 0,5$ versus $4,1 \pm 0,7$ $\mu\text{mol/g}$ de matière sèche, respectivement). Cependant, les teneurs mesurées sur le colza MS11 T restent inférieures à la limite recommandée par l'OCDE (2011). Par ailleurs, les protéines Barstar et Barnase ne sont pas détectées dans les différents produits transformés et la protéine PAT n'est pas détectée dans le tourteau toasté ni les huiles brutes et raffinées.

II.1.3.7. Conclusions de l'évaluation comparative

L'analyse de composition et la caractérisation agronomique et phénotypique du colza MS11 montrent qu'à l'exception de la tolérance au glufosinate-ammonium, ce colza peut être considéré comme équivalent à un colza conventionnel.

II.1.4. Toxicologie

II.1.4.1. Analyse des protéines nouvellement exprimées

La seule référence aux études de toxicité sur des rongeurs par administration unique se trouve dans le document consacré à l'évaluation de l'exposition et ne concerne que la protéine PAT. Il est donc nécessaire que le pétitionnaire fournisse tous les résultats disponibles et les références associées pour les différentes protéines nouvellement exprimées dans le colza MS11.

Par ailleurs, il fournit 3 études de toxicité orale (gavage) sur 28 jours chez la souris, l'une menée avec la protéine Barnase (doses utilisées : 0,95 ; 2,85 et 9,50 mg/kg p.c./jour), la deuxième avec la protéine Barstar (doses utilisées : 1, 3 et 10 mg/kg p.c./jour) et la troisième avec un mélange des deux protéines (doses utilisées : 2, 6 et 20 mg/kg p.c./jour). Des différences statistiquement significatives sont observées entre les groupes traités et témoins des deux premières études :

- dans celle menée avec la protéine Barnase : augmentation du poids absolu et relatif du thymus chez les femelles et du poids relatif de l'épididyme chez les mâles à la dose la plus élevée, et diminution du poids absolu et relatif de la prostate chez les mâles à la dose la plus faible. Ces modifications ne sont pas accompagnées d'altérations histologiques des organes ;

² www.cropcomposition.org

- dans celle menée avec la protéine Barstar : diminution du poids des vésicules séminales à la plus forte dose, et à la dose la plus faible, atrophie des vésicules séminales chez les mâles et augmentation du poids du cœur chez les femelles, sans relation avec la dose.

Pour la protéine Barnase, les modifications pondérales du thymus et de l'épididyme sont sans traduction histologique. La diminution du poids de la prostate est la conséquence d'une valeur très faible (outlier) chez un seul animal. En l'absence des données historiques du centre investigateur, le GT « Biotechnologie » n'est pas en mesure de se prononcer sur la signification biologique des variations de poids du thymus et des vésicules séminales.

L'étude associant les deux protéines ne met pas en évidence de différence statistiquement significative.

Enfin, si une (des) étude(s) de toxicité orale (gavage) sur 28 jours chez la souris a (ont) été menée(s) avec la protéines PAT, les résultats et les références associées devront être rappelés dans le dossier.

II.1.4.2. Analyse des nouveaux constituants autres que les protéines

Le pétitionnaire ne fournit pas d'information sur la présence éventuelle de nouveaux constituants.

II.1.4.3. Informations sur les constituants naturels de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux

Aucune analyse n'a été réalisée sur des denrées alimentaires ou des aliments pour animaux dérivés du colza MS11.

II.1.4.4. Analyse de l'aliment (denrée alimentaire ou aliment pour animaux) génétiquement modifié entier

Une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours sur rongeur a été menée en 2015-2016, selon un protocole s'appuyant sur la ligne directrice OCDE 408 (1998) et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL).

Trois groupes de 16 rats mâles et 16 rats femelles, lignée Sprague Dawley, ont été nourris avec des régimes alimentaires contenant 15 % (p/p) de tourteaux déshuilés et non dépelliculés obtenus à partir de graines du colza MS11, du témoin isogénique N90-740 et d'une variété commerciale non génétiquement modifiée. Le pétitionnaire devra préciser si le colza génétiquement modifié a été traité avec l'herbicide auquel il est tolérant. Les analyses réalisées sur les aliments distribués aux 3 groupes d'animaux montrent qu'ils sont équivalents sur le plan nutritionnel et en termes de teneurs en contaminants, notamment en ce qui concerne les résidus de glufosinate-ammonium.

Le nombre d'animaux utilisés correspond aux recommandations de l'Anses (2011) et du Comité scientifique de l'EFSA (2011) en la matière. En revanche, les données brutes sous format électronique et les programmes de calcul ne sont pas fournis. Par ailleurs, le Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013, en vigueur pour ce dossier, précise que pour les études de toxicité sub-chronique de 90 jours sur rongeur, *"Il y a lieu d'utiliser, en principe, au moins deux doses d'essai et un échantillon de contrôle négatif. La dose la plus élevée doit être la dose maximale qu'il est possible d'atteindre sans entraîner de déséquilibre nutritionnel ; la dose la plus faible doit toujours contenir une quantité de la denrée alimentaire et/ou de l'aliment pour animaux étudiés supérieure à l'apport attendu chez l'homme ou l'animal cible. L'aliment (denrée alimentaire ou aliment pour animaux) génétiquement modifié analysé doit être en rapport avec le produit destiné à être consommé."* Or, le pétitionnaire a utilisé une dose unique de 15 % (p/p) de tourteau déshuilé et non dépelliculé, en faisant référence au guide EFSA (2014) pour justifier ce choix, mais ce guide donne 25 % comme valeur de référence pour le tourteau de colza. De plus, la sécurité de l'huile destinée à l'alimentation humaine n'est pas documentée, puisque l'aliment n'en contient pas.

II.1.4.5. Conclusions de l'évaluation toxicologique

Dans l'état actuel du dossier, il n'est pas possible de conclure quant à la sécurité des protéines Barnase, Barstar et PAT et à celle du colza MS11.

II.1.5. Allergénicité

II.1.5.1. Évaluation de l'allergénicité de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s)

Le pétitionnaire fonde l'évaluation de l'allergénicité des protéines Barnase, Barstar et PAT exprimées dans le colza MS11 sur deux critères :

- 1) absence d'homologie de séquence entre chacune de ces protéines et des allergènes connus lorsque la recherche est effectuée sur la totalité de la séquence ou avec des fenêtres glissantes de 80 résidus ;
- 2) faible résistance des trois protéines à la protéolyse digestive et à la dénaturation thermique (cuisson).

Le pétitionnaire n'a pas suivi toutes les recommandations du Panel GMO de l'EFSA (2011). En effet, il ne présente pas d'analyse de l'allergénicité potentielle des organismes sources (*S. hygroscopicus* pour la protéine PAT et *B. amyloliquefaciens* pour les protéines Barnase et Barstar). Par ailleurs, la recherche d'homologies de séquence entre les trois protéines nouvellement exprimées et des allergènes connus n'a pas été menée avec des fenêtres glissantes de 8 résidus. Enfin, le pétitionnaire n'intègre pas dans son évaluation les données relatives aux faibles teneurs de ces trois protéines dans les graines du colza MS11. Le GT « Biotechnologie » a réalisé ces analyses. Ses résultats et ceux présentés par le pétitionnaire montrent que le potentiel allergénique des protéines Barnase, Barstar et PAT exprimées dans le colza MS11 est extrêmement faible.

Les analyses bioinformatiques ne mettent pas en évidence d'homologie de séquence entre les protéines Barnase, Barstar et PAT et les adjuvants classiques comme les toxines bactériennes. Par ailleurs, les faibles teneurs de ces protéines dans le colza MS11 et leur sensibilité aux protéases digestives et à la dénaturation thermique sont *a priori* incompatibles avec un éventuel effet adjuvant significatif dans le cadre d'un apport alimentaire modéré en colza génétiquement modifié.

II.1.5.2. Évaluation de l'allergénicité de la plante génétiquement modifiée entière

L'huile de colza raffinée, décolorée et désodorisée, exempte de protéines et donc d'allergènes, est de très loin l'huile de colza la plus utilisée, essentiellement comme huile d'assaisonnement et de cuisson. Par conséquent, l'allergie alimentaire au colza ne pourrait provenir que de l'huile de colza vierge extraite par pression à froid, susceptible de contenir des traces d'albumine 2S (Bra n 1). Cette huile est utilisée uniquement pour l'assaisonnement et sa production est peu importante. Par ailleurs, aucune des informations disponibles ne laisse supposer que le colza MS11 puisse développer une allergénicité différente de celle des variétés de colza non génétiquement modifiées. Le risque allergénique du colza MS11 est donc faible et *a priori* équivalent à celui des variétés de colza conventionnelles.

II.1.5.3. Conclusions de l'évaluation de l'allergénicité

Sur la base des données fournies par le pétitionnaire et des analyses réalisées par le GT « Biotechnologie », le potentiel allergénique des protéines Barnase, Barstar et PAT exprimées dans le colza MS11 peut être considéré comme négligeable. Par ailleurs, ces protéines n'ont apparemment pas de propriétés adjuvantes. Enfin, l'allergénicité du colza MS11 reste vraisemblablement faible et identique à celle d'un colza conventionnel.

II.1.6. Evaluation nutritionnelle

Le pétitionnaire a réalisé une évaluation nutritionnelle des tourteaux toastés issus des colzas MS11, isogénique et d'une variété commerciale dans l'alimentation de poulets à croissance rapide et de barbues de rivière. Il est regrettable que ces études ne soient pas citées dans le document principal ("Main text").

Pour l'essai mené sur poulets, le tourteau était incorporé à 10 % dans les aliments de démarrage (0-7 jours), de croissance (8-21 jours) et de finition (22-42 jours). Des poulets Ross 708 ont été élevés pendant 42 jours en parquet de 10 animaux. Il y avait 7 parquets par sexe et par groupe. L'analyse de composition des différents régimes n'a pas mis en évidence de différence entre les lots, y compris concernant les résidus de glufosinate-ammonium. L'étude n'a pas mis en évidence d'effet du traitement alimentaire sur les performances de croissance et la mortalité en élevage des poulets, ni sur leur rendement en carcasse ou en viande après abattage.

Pour les barbues de rivière, le tourteau était incorporé à 30 % dans l'aliment. Les poissons étaient âgés de 17 semaines au début de l'essai qui a duré 56 jours après une semaine d'acclimatation des poissons dans leur aquarium. Chaque lot comportait 4 aquariums contenant 20 poissons chacun. L'analyse de composition des différents régimes n'a pas mis en évidence de différence entre les lots, y compris concernant les résidus de glufosinate-ammonium. Aucune différence n'est observée entre le lot MS11 et le témoin isogénique sur la mortalité, le comportement, le poids vif et l'efficacité alimentaire des poissons. En revanche, ces deux lots présentaient des poids vifs et une efficacité alimentaire inférieurs à ceux du lot contenant la variété commerciale non génétiquement modifiée.

II.2 Évaluation de l'exposition - Prévision de la quantité consommée ou de l'étendue de l'utilisation

Seule l'huile raffinée est utilisée en alimentation humaine. Le pétitionnaire considère que les protéines Barstar, Barnase et PAT n'étant pas détectées dans cet aliment, l'exposition est nulle pour l'Homme.

Les protéines Barstar, Barnase et PAT ne sont pas détectées non plus dans les tourteaux toastés. Seuls les animaux consommant du fourrage sont concernés par l'exposition à ces protéines. Dans un scénario du "pire des cas", l'exposition maximale est de 40 g de colza MS11/kg de poids vif/jour, soit 1 100,80 µg de protéine PAT/kg de poids vif/jour et 11,20 µg de protéine Barstar/kg de poids vif /jour pour les bovins en Australie.

II.3 Caractérisation des risques

En l'absence d'études de toxicité et d'alimentarité réalisées sur des bovins, le risque ne peut pas être caractérisé pour ces animaux.

Chez l'Homme, le pétitionnaire présente un calcul de marges de sécurité fondé sur les résultats d'une étude de toxicité aiguë sur la souris par administration orale unique de la protéine PAT (Cf. II.1.4.1.) et sur les teneurs des protéines nouvellement exprimées dans les graines au lieu des teneurs mesurées dans l'huile raffinée. Le GT « Biotechnologie » considère que cette démarche n'est pas adaptée. De plus, le GT « Biotechnologie » estime que chez l'Homme, l'exposition liée à la consommation d'huile raffinée est très faible, car les teneurs des protéines nouvellement exprimées dans l'huile raffinée sont inférieures aux limites de quantification des méthodes d'analyse utilisées.

II.4 Surveillance de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifié(e) consécutive à sa mise sur le marché

Le pétitionnaire n'a pas proposé de plan de surveillance de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifié(e) consécutive à sa mise sur le marché.

Conclusions du Groupe de travail « Biotechnologie »

Les éléments présentés dans le dossier concernant la caractérisation moléculaire du colza MS11 permettent de caractériser ce colza et ne sont pas évocateurs d'un risque lié à son utilisation en alimentation animale ou humaine. Toutefois, il serait utile que le pétitionnaire réalise une étude de la transcription de la région située en 3' de l'insert, afin de vérifier si l'expression de l'ORF qui s'y trouve est modifiée suite à l'insertion de l'ADN-T. Par ailleurs, le pétitionnaire ne montre pas que ce colza est mâle stérile.

L'analyse de composition et la caractérisation agronomique et phénotypique du colza MS11 montrent qu'à l'exception de la tolérance au glufosinate-ammonium, ce colza peut être considéré comme équivalent à un colza conventionnel. Bien que le pétitionnaire indique que des études d'alimentarité ne sont pas nécessaires, compte tenu de cette démonstration de l'équivalence, il fournit des études d'alimentarité réalisées chez le poulet et la barbue de rivière sans les citer dans le document principal. Elles permettent de confirmer que la valeur nutritionnelle de ce colza ne paraît pas différente de celle d'un colza conventionnel. Sur la base des éléments fournis par le pétitionnaire et des analyses réalisées par le GT « Biotechnologie », le potentiel allergénique de ce colza et de ses produits dérivés paraît négligeable.

En revanche, les éléments présentés dans le dossier concernant l'évaluation toxicologique ne permettent pas de conclure quant à la sécurité des protéines Barnase, Barstar et PAT et à celle du colza MS11.

Dans ces conditions le GT « Biotechnologie » ne peut pas se prononcer sur la sécurité sanitaire du colza MS11.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du GT « Biotechnologie » et émet un avis défavorable à la demande d'autorisation de mise sur le marché du colza MS11 au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003.

Dr Roger GENET

MOTS-CLES

OGM, colza MS11, stérilité mâle, restauration de la fertilité, Barnase, Barstar, tolérance au glufosinate-ammonium, PAT

GMO, MS11 *Brassica napus*, male sterility, fertility restoration, Barnase, Barstar, glufosinate-ammonium tolerance, PAT

BIBLIOGRAPHIE

- Anses (2011). Recommandations pour la mise en œuvre de l'analyse statistique des données issues des études de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rat dans le cadre des demandes d'autorisation de mise sur le marché d'OGM. Avis de l'ANSES, rapport d'expertise collective, 95 pages.
- EFSA. 2014. "Explanatory statement for the applicability of the Guidance of the EFSA Scientific Committee on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed for GMO risk assessment." *EFSA Journal* 12 (10): 3871, 25 pp.
- EFSA GMO Panel. 2006. "Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed." *EFSA Journal* 99: 1-100.
- EFSA GMO Panel. 2010. "Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs." *EFSA Journal* 8 (2): 1250, 59 pp.
- EFSA GMO Panel. 2011. "Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants." *EFSA Journal* 9 (5): 2150, 37 pp.
- EFSA Scientific Committee. 2011. "Guidance on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed." *EFSA Journal* 9 (12): 2438, 21 pp.
- James, C. 2014. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. ISAAA Brief No. 49. ISAAA: Ithaca, NY.
- NF X50-110:2003 Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).
- OCDE. 1998. "OECD Guideline for the testing of chemicals N°408. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents." Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France).
- OCDE. 2011. "Revised consensus document on compositional considerations for new varieties of low erucic acid rapeseed (canola): key food and feed nutrients, anti-nutrients and toxicants" Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 24. Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France).
- Règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés. JO L 268 du 18.10.2003, pp. 1-23.
- Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 de la Commission du 3 avril 2013 relatif aux demandes d'autorisation de denrées alimentaires et d'aliments pour animaux génétiquement modifiés introduites en application du règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements de la Commission (CE) n° 641/2004 et (CE) n° 1981/2006. JO L 157 du 8.6.2013, pp. 1-48.