

Maisons-Alfort, le 13 mai 2004



LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un colza contenant les événements Ms8, Rf3 et Ms8xRf3 pour culture et importation pour tous usages sur le territoire de l'Union européenne au titre de la directive 2001/18

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 21 avril 2004 par la Direction générale de l'alimentation d'une demande d'avis sur un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un colza contenant les événements Ms8, Rf3 et Ms8xRf3 pour culture et importation pour tous usages sur le territoire de l'Union européenne au titre de la directive 2001/18/CE (dossier déposé en Belgique n° C/BE/96/01).

Cette demande porte sur une actualisation de la notification conformément à l'article 35 de la directive 2001/18/CE d'un dossier initial déposé en 1996 auprès des autorités compétentes belges, complété en 1997 puis en 2001 dans le cadre de la procédure 90/220/CE.

CONTEXTE

Le dossier initial avait été examiné le 9 décembre 1997 par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France qui avait rendu un avis défavorable considérant que l'équivalence en substance était mal établie, qu'il aurait été nécessaire de disposer d'au moins une étude sur animaux de ferme nourris avec ce colza transgénique et qu'aucune information n'était disponible pour évaluer l'absence d'allergénicité et de toxicité de la protéine PAT. En 1998, le Comité Scientifique européen des Plantes (SCP) avait rendu un avis favorable pour ce dossier.

Par ailleurs, l'huile de colza produite à partir de graines de colza portant les événements de transformation Ms8 et Rf3 est autorisée à la consommation humaine depuis novembre 1999 au titre du règlement (CE) n°258/97.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 13 mai 2004, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

LE PRINCIPE DE LA TRANSFORMATION

L'objectif de la transformation est de créer un système de stérilité mâle nucléaire et le système correspondant de restauration de la fertilité, de sorte à faciliter l'obtention d'hybrides chez le colza et de rendre ces hybrides tolérants à un herbicide. Le système consiste en :

- une stérilité mâle (Ms) assurée par expression spécifiquement dans les cellules du tapis des anthères d'une ribonucléase, dont l'effet est de dégrader les ARN cellulaires, bloquant ainsi le fonctionnement des cellules normalement à l'origine des grains de pollen. Il s'agit d'un gène suicide à expression exclusive dans les cellules ciblées, associé à un gène de sélection conférant la résistance à une molécule herbicide (dans le cas présent le glufosinate d'ammonium) ;
- une restauration de la fertilité (Rf) par expression dans les mêmes cellules d'une protéine inhibitrice de cette ribonucléase, permettant aux cellules portant les deux transgènes de rester en vie et de poursuivre leur différenciation jusqu'à permettre la production normale de gamètes mâles. Le gène codant l'inhibiteur de ribonucléase est associé à un gène de sélection conférant la même résistance (dans le cas présent au glufosinate d'ammonium).

Les plantes hybrides 100 % fertiles et tolérantes au glufosinate seront issues de graines récoltées sur les plantes mâle-stériles après pollinisation par les plantes restauratrices, une moitié portant à la fois les événements Ms8 et Rf3, l'autre moitié portant seulement Rf3.

INFORMATION RELATIVE AUX CONSTRUCTIONS GENETIQUES

Deux constructions génétiques sont utilisées pour créer le couple stérilité mâle (Ms8)/restauration de fertilité (Rf3). Dans les 2 cas, la transformation a été réalisée via *Agrobacterium tumefaciens*, sur tissu de colza double zéro (ne produisant ni glucosinolate ni acide érucique) variété Drakkar. Les transgènes peuvent ensuite être introduits par croisement classique dans toute variété de colza ou toute autre plante sexuellement compatible avec le colza.

Evènement Ms8

Considérant que :

- la construction introduite (ADN-T) dans le génome nucléaire du colza est constituée de deux gènes, dont les séquences codantes sont issues, l'une du gène *barnase* isolé de *Bacillus amyloliquefaciens* codant la protéine BARNASE et conférant la stérilité mâle, et l'autre du gène *bar* isolé de *Streptomyces hygroscopicus*, codant la protéine PAT (phosphinotricine acétyl transférase) et conférant la tolérance au glufosinate d'ammonium ;
- le gène *barnase* est contrôlé par le promoteur TA29 de *Nicotiana tabacum* et le gène *bar* par le promoteur du gène codant la petite sous unité de la RUBISCO d'*Arabidopsis thaliana* ;
- l'évènement de transformation Ms8 correspond à l'insertion dans le génome du colza d'une copie unique de l'ADN-T issu du plasmide pTHW107 ;
- l'intégrité de l'ADN-T a été vérifiée par séquençage de l'ADN inséré dans le génome du colza MS8 ;
- il a été vérifié qu'aucun ADN plasmidique extra-bordures n'a été intégré ;
- la stabilité de l'insertion a été vérifiée sur plusieurs générations de colza Ms8 ;
- l'insertion de l'évènement Ms8 a eu lieu dans le génome A du colza (originaire de *Brassica rapa*) ;

Considérant que :

- au niveau de la bordure droite de l'ADN-T, l'intégration s'est accompagnée de la perte de 3 pb (paire de bases) du plasmide, et l'addition de 3 pb ;
- l'analyse *in silico* de la séquence de 864 pb du génome de colza flanquant la bordure droite de l'ADN-T ne permet d'identifier aucune homologie avec des séquences connues ; les similarités les plus significatives sont de 82 % sur 72pb/87 avec une séquence présente sur le chromosome 5 d'*Arabidopsis* et de 85 % sur 53pb/62 avec une séquence présente sur le chromosome 3 d'*Arabidopsis* ;
- au niveau de la bordure gauche de l'ADN-T, l'intégration s'est accompagnée de la perte de 24 pb du plasmide, de la perte de 19 pb par rapport au locus sauvage chez le colza ;
- au-delà de la bordure gauche, aucune homologie significative n'a été révélée *in silico* pour les 357 pb flanquantes de génome de colza ;
- l'analyse approfondie *in silico* ne permet de prédire aucun nouveau produit de transcription potentielle au niveau des jonctions entre ADN-T et ADN du colza ;

Evènement Rf3

Considérant que :

- la construction (ADN-T) introduite dans le génome nucléaire du colza est constituée de deux gènes, dont les séquences codantes sont issues, l'une du gène *barstar* isolé de *Bacillus amyloliquefaciens* codant la protéine BARSTAR, inhibiteur de la ribonucléase, permettant la restauration de la stérilité, et l'autre du gène *bar* isolé de *Streptomyces hygroscopicus*, codant la protéine PAT (phosphinotricine acétyl transférase) et conférant la tolérance au glufosinate d'ammonium ;
- le gène *barstar* est contrôlé par le promoteur TA29 de *Nicotiana tabacum* et le gène *bar* par le promoteur du gène codant la petite sous unité de la RUBISCO d'*Arabidopsis thaliana* ;
- l'évènement de transformation Rf3 correspond à l'insertion dans le génome du colza d'une copie presque complète d'ADN-T issu du pTHW118, liée en orientation inversée à une autre copie, incomplète du gène chimérique codant l'inhibiteur de la ribonucléase ;
- l'intégrité de l'ADN-T a été vérifiée par séquençage de l'ADN-T dans le génome du colza Rf3 ;
- il a été vérifié qu'aucun ADN plasmidique extra-bordures n'a été intégré ;
- la stabilité de l'insert a été vérifiée sur plusieurs générations de colza Rf3 ;

- l'insertion de l'événement Rf3 a eu lieu dans le génome C du colza (originaire de *Brassica oleracea*) ;

Considérant que :

- au niveau de la bordure droite de l'ADN inséré, l'intégration s'est accompagnée de la perte de 40 pb du plasmide et l'addition de 5 pb ;
- l'insertion est encadrée d'une duplication de 812 pb du génome du colza, ne présentant d'homologie avec aucune séquence génomique répertoriée dans les banques de données ;
- du côté flanquant l'extrémité de l'insertion consistant en un ADN-T tronqué, la région de 459 pb séquencée au-delà des 812 pb dupliquées est partiellement homologue (à 90 %) sur 88pb/97 avec une séquence présente sur le chromosome 1 d'*Arabidopsis* et (à 88 %) sur 46pb/52 avec une séquence présente sur le chromosome 5 d'*Arabidopsis* ;
- l'analyse approfondie *in silico* ne permet de prédire aucun nouveau produit de transcription potentielle au niveau des jonctions entre ADN-T et ADN du colza ;

INFORMATIONS RELATIVES A L'EXPRESSION DES TRANS GENES

Considérant que des expériences type "northern" d'hybridation d'ARN extraits de différents tissus des colzas Ms8 et Rf3 (feuilles, bourgeons floraux et graines sèches, ainsi que pollen chez le mâle fertile Rf3) avec des ribosondes sens et antisens correspondant aux différents transgènes ont révélé que les gènes sont transcrits comme attendus, et qu'aucune transcription antisens n'a lieu ;

Considérant que l'ARNm *barnase* n'est décelable dans aucun tissu de Ms8, conformément à ce qui est attendu de la stricte spécificité du promoteur TA29, puisque son expression a pour effet d'empêcher la poursuite du développement des cellules qui l'expriment ;

Considérant que l'ARNm *barstar* n'est décelable que dans les bourgeons floraux de Rf3 où il représente 1,2 à 2,4 pg/µg d'ARN total conformément à ce qui est attendu de la stricte spécificité du promoteur TA29, dans le tapis des anthères ;

Considérant l'ARNm *bar* ne s'accumule pas à un niveau détectable en "northern" dans les graines sèches des 2 lignées, ni dans le pollen de la lignée Rf3 et que dans les feuilles et les bourgeons floraux, il représente 0,03 à 0,22 pg/µg d'ARN total chez Ms8, et 0,2 à 1,1 pg/µg d'ARN total chez Rf3 ;

INFORMATIONS RELATIVES A L'ACTIVITE DE LA PROTÉINE PAT

Considérant que la quantité de protéine PAT mise en évidence par test ELISA est seulement de l'ordre de 0,001 % des protéines totales extractibles comme attendu puisque la transcription du transgène est contrôlée par un promoteur spécifique des parties vertes de la plante ;

Considérant que dans les feuilles, les dosages d'activité PAT permettent de conclure que la protéine codée par le transgène représente en moyenne 0,51 µg/mg de protéines chez Ms8 et en moyenne 1,32 µg/mg de protéines chez Rf3 ;

INFORMATIONS RELATIVES A LA COMPOSITION CHIMIQUE DES COLZAS MS8, RF3 ET MS8XRf3

Considérant que de nombreuses analyses de composition (lipides, acides gras, acides aminés, protéines, alpha-tocophérol, acide phytique, cendres, fibres brutes, glucosinolates) sont présentées à partir de cultures colza Ms8, Rf3 et Ms8xRf3 sur plusieurs sites européens et canadiens et sur plusieurs années de production ;

Considérant que les résultats présentés montrent parfois des différences selon les lignées mais, qu'en raison de la présentation peu claire des résultats statistiques, il n'est pas possible d'en conclure à l'existence d'une différence significative ou non ;

Considérant en conséquence que l'équivalence nutritionnelle, malgré de très nombreux résultats fournis, reste mal établie et que même si les résultats semblent s'inscrire dans les limites de variabilité naturelle, la part entre les facteurs de variations liés aux sites de culture et l'année de production reste difficile à faire ;

Considérant que les compléments d'information fournis depuis 1997 n'ont pas apporté d'éléments nouveaux relatifs à l'équivalence nutritionnelle des colzas Ms8, Rf3 et Ms8xRf3 par rapport au colza non modifié ;

ETUDE DE TOLERANCE ET DE VALEUR NUTRITIVE CHEZ L'ANIMAL CIBLE

Considérant qu'une étude de valeur nutritive a été réalisée sur 30 lapins pendant 14 jours, consistant à mesurer la digestibilité des nutriments de graines de colza Ms8xRf3 comparé à des graines témoins, les graines étant incorporées à raison de 30 % (en dilution) dans un aliment complet équilibré ;

Considérant que l'incorporation de 30 % de graines de colza dans un aliment pour lapin est considérée comme élevée, mais justifiée pour permettre un calcul (méthode par différence) de la valeur nutritive des graines de colza testées, mais que cela présente par contre l'inconvénient d'accroître très fortement la concentration en lipides des régimes, qui atteint ici 15 % ;

Considérant que ce taux, jamais rencontré en pratique d'élevage cunicole, oblige ainsi les expérimentateurs à devoir granuler trois fois de suite ces aliments pour les rendre distribuables aux animaux et qu'une triple granulation affecte la qualité physique (granulométrie), voire la valeur nutritive des aliments, sans qu'il soit précisé si le même traitement est appliqué au régime de base ;

Considérant que, du fait de la très forte incorporation du colza dans les aliments, la composition chimique des aliments comparés n'est pas équilibrée pour un lapin en croissance, et que cela s'est traduit par une sous-consommation et une faible croissance des animaux durant la période d'adaptation aux régimes et par une croissance compensatrice durant la période de mesure, affaiblissant ainsi la validité des mesures ;

Considérant que d'une part, les valeurs trouvées de digestibilité des fibres contenues dans les graines de colza sont relativement élevées mais difficiles à interpréter comme étant un effet provenant complètement de la composition chimique ou d'un effet granulation, et d'autre part que l'observation d'une valeur de digestibilité des fibres (NDF¹ et ADF²) très élevée, inhabituelle chez cette espèce, mériterait d'être confirmée par une étude de valeur alimentaire plus précise (méthode par régression) avec au moins deux taux d'incorporation différents (mais inférieurs à 30 %), et en donnant l'ensemble des données individuelles : poids, ingestion, excrétion aux différentes périodes ;

Considérant que le calcul par différence des coefficients de digestibilité des 2 types de graines de colza montre des écarts non significatifs entre le témoin et l'hybride, excepté une tendance à une moindre teneur en énergie digestible de la lignée hybride (P=0.08), en cohérence avec la moindre teneur en lipide de cette lignée ;

Considérant en conséquence que les résultats de cette étude de digestibilité de l'hybride Ms8xRf3 ne peuvent remplacer une étude d'alimentarité pour l'animal de rente où l'on étudie la croissance, l'ingestion et l'état sanitaire des animaux sur une période complète de croissance (en général, entre le sevrage et l'âge d'abattage, soit pour le lapin une période de 6 semaines), et pour un effectif plus élevé d'animaux (au moins 40 répétitions par traitement dans le cas du lapin) ;

ETUDE A DES FINS ENVIRONNEMENTALES DE LA TOXICITE DES GRAINES DE COLZA CHEZ LE SERIN ET DE LA VALEUR ALIMENTAIRE DES FEUILLES DE COLZA CHEZ LE LAPIN

Considérant que ces deux études (qui figurent dans le dossier relatif à la mise sur le marché de l'hybride Ms8xRf3) portant sur l'hybride Ms1xRf1 (autres événements de transformation), n'ont en conséquence pas été prises en compte ;

¹ NDF : teneur en paroi cellulaire estimée par le résidu obtenu à la suite d'un traitement contenant un détergent neutre.

² ADF : résidu après traitement par un détergent acide.

ETUDE D'ALIMENTARITE CHEZ LEPOULET

Considérant qu'il est fait état à l'annexe II du complément d'information de décembre 2002 (§ 7.2 page 38/51) d'un essai chez le poulet mâle nourri pendant 42 jours avec des graines de colza génétiquement modifié ou son équivalent isogénique mais que les données relatives à cette étude ne figurent pas dans le dossier transmis,

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que les données disponibles relatives à l'étude de valeur nutritive des graines de colza chez le lapin ne permettent pas d'évaluer la sécurité sanitaire du colza génétiquement modifié Ms8XRf3 destiné à l'alimentation animale.

Pour évaluer la sécurité sanitaire d'un colza portant les événements de transformation Ms8 et Rf3, il conviendrait de disposer des informations suivantes :

- l'étude d'alimentarité chez le poulet dont il est fait état à l'annexe II du complément d'information de décembre 2002 (§ 7.2 page 38/51) ;
- une étude de toxicité/tolérance de 90 jours sur animal de laboratoire nourri avec des graines de colza portant les événements de transformation Ms8 et Rf3 afin de vérifier l'absence d'effets néfastes ou toxiques de ces graines de colza.

Martin HIRSCH