

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

relatif à un dossier de demande de mise sur le marché, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003, du colza génétiquement modifié MON88302, développé pour être tolérant à un herbicide, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM.

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 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 rendus publics.

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a été saisie le 17 avril 2012 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes, d'une demande d'avis relatif à un dossier de mise sur le marché, au titre du règlement (CE) n°1829/2003, du colza génétiquement modifié MON88302, développé pour être tolérant à un herbicide, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier EFSA-BE-2011-101).

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 Etats-membres de faire connaître leurs observations sur le dossier initial. C'est dans ce cadre que la DGCCRF a sollicité l'avis de l'Anses.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été effectuée par le Comité d'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 24 mai 2012. L'évaluation du dossier se base sur les lignes directrices de l'EFSA¹ et sur les éléments complémentaires jugés nécessaires par les experts du CES Biotechnologie.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

Le colza (*Brassica napus*) est une plante annuelle à fleurs jaunes de la famille des Brassicacées, précédemment dénommée Crucifères. Le colza contient naturellement des anti-nutriments comme l'acide érucique et les glucosinolates. Des variétés destinées à la consommation humaine et animale ont été développées par sélection pour permettre l'obtention d'une huile pauvre en acide érucique (<2%) et de tourteaux ayant une teneur en glucosinolates inférieure à la valeur standard définie par l'OCDE (30µmoles/g).

Le colza est largement cultivé pour la production d'huile alimentaire (dont la teneur dans les graines est d'environ 40 à 45 %) et d'agro-carburant.

(A) Information générale

Le présent dossier est une première demande de mise sur le marché dans l'Union Européenne pour l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale. La demande exclut la mise en culture.

La modification génétique introduite dans les colzas MON88302 est constituée d'un ADN-T portant la cassette d'expression du gène CP4epsps qui leur confère la tolérance au glyphosate. Ce colza, résistant au glyphosate est dit de deuxième génération car l'expression du gène en particulier dans le pollen permet de diminuer l'impact de l'herbicide sur la fertilité mâle lors de traitement plus tardif.

(C) Informations relatives à la modification génétique

(1-2) La lignée transgénique MON 88302 a été obtenue par transformation d'hypocotyles du cultivar Ebony à l'aide d'une souche désarmée d'*Agrobacterium tumefaciens* portant le plasmide de transformation. Le plasmide, d'une taille de 9664 paires de bases (pb) est constitué d'un ADN de transfert (ADN-T) portant le gène d'intérêt et les bordures droite et gauche nécessaires à son transfert dans les cellules végétales.

Le plasmide possède aussi tous les éléments nécessaires à sa répllication dans *E. coli*, sa répllication dans *A. tumefaciens* (*oriV*) et le gène *aadA* conférant la résistance aux antibiotiques spectinomycine et streptomycine pour la sélection des bactéries lors des étapes de clonage.

(3) Plus précisément, l'ADN-T de 4410pb comporte les éléments suivants :

- la bordure droite de l'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens* ;
- le promoteur chimérique constitué du promoteur *Tsf1* d' *A. thaliana* (promoteur du gène codant pour le facteur d'élongation de la transcription EF-1alfa) et des séquences activatrices dérivées du promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque de la scrofulaire (Figwort Mosaic Virus) ;
- les séquences « 5'UTR » et du premier intron du gène *Tsf1* d' *A. thaliana* (gène codant pour le facteur d'élongation de la traduction EF-1alfa)

¹ Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants, The EFSA Journal 2011; 9(5): 2150.

Guidance document of the scientific panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plant, The EFSA Journal 2006; 99, 1-100.

- la séquence codante du peptide "leader" d'adressage vers les chloroplastes, du gène *epsps* d'*A. thaliana* ;
- la séquence codante (optimisée pour une expression chez les plantes) du gène de la 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase d'*Agrobacterium* souche CP4 (CP4EPSPS) ;
- la séquence « 3'UTR » dérivée du gène *rbcS2* codant pour la petite sous-unité de la RuBisCO du pois (*Pisum sativum*) ;
- la bordure gauche de l'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens*.

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

(1) La construction introduite est constituée d'un gène codant pour la protéine CP4 EPSPS conférant la tolérance au glyphosate sous le contrôle d'un promoteur chimérique permettant l'expression du transgène dans différents tissus ainsi que dans le pollen. Cette expression dans le pollen permet d'effectuer des traitements herbicide jusqu'aux premiers stades de la floraison sans qu'il y ait d'impact du traitement sur la fertilité.

(2) Informations relatives aux séquences réellement insérées

Des hybridations de type Southern ont été réalisées sur plusieurs profils de restrictions avec plusieurs sondes couvrant chaque élément de l'ADN-T ainsi qu'avec de l'ADN plasmidique situé en dehors de l'ADN-T.

Par ailleurs, la construction insérée a été entièrement séquencée de même que les régions du génome en bordures droite et gauche (5' et 3') de l'insertion sur respectivement 839 et 906 nucléotides. Les résultats des hybridations et l'analyse des séquences montrent que :

- le transgène est présent en une copie unique dans le génome du colza ;
- le transgène est complet et intact dans le génome du colza ;
- la séquence du transgène insérée dans le colza correspond à celle de l'ADN-T du plasmide de transformation ;
- aucune autre séquence originaire du plasmide n'est présente ;

La comparaison des séquences situées en 5' et en 3' de l'insertion avec celle du colza témoin Ebony montre que ces séquences sont contiguës dans la lignée non-transgénique. Elle met en évidence la disparition de 29 bp de l'ADN génomique au niveau de la jonction 3' de l'insertion ainsi que l'addition de 9 bp. Une mutation ponctuelle de type SNP est aussi observée dans la région adjacente 3'.

L'analyse bioinformatique (BLASTn et BLASTx) montre que l'insertion ne semble pas interrompre de gène dans le génome de colza.

La recherche de nouvelles phases ouvertes de lecture (ORF) aux niveaux des jonctions 5' et 3' avec le génome a été effectuée. Onze ORF potentielles ont été identifiées et analysées vis à vis des banques d'allergènes et de toxines. Aucune de ces séquences ne présente d'homologies avec les allergènes et les toxines connus.

(3) Informations relatives à l'expression du produit du gène

Les teneurs de la protéine CP4EPSPS ont été mesurées dans les graines et quelques tissus (fourrage, feuilles, racines) par ELISA à partir de colza cultivés en 2009 aux USA et Canada, avec et sans traitement par l'herbicide. La protéine est présente à raison de 25 µg/g (écart type=5,2) de poids frais pour les graines provenant des colzas traitées au glyphosate et 29 µg/g (écart type=5,0) de poids frais pour les graines provenant des colzas non traités.

Étant donné la nature du promoteur et selon les lignes directrices de l'EFSA¹, il est nécessaire de disposer d'information sur le niveau d'expression du transgène dans le pollen.

Par ailleurs, le tourteau obtenu après extraction de l'huile est utilisé dans l'alimentation des poulets, porcs, bovins et poissons, seule l'huile est consommée par l'Homme. La protéine CP4EPSPS est essentiellement présente dans le tourteau destiné à l'alimentation animale. Considérant la quantité totale de protéine dans l'huile (moins de 0,2 ppm) et la faible concentration en protéine CP4EPSPS dans la graine (0,01%), la teneur en protéine CP4EPSPS dans l'huile raffinée est extrêmement faible (de l'ordre de 0,02 ppm) excluant l'existence d'un risque lié à la présence de cette protéine dans l'huile.

(5) Informations relatives à la stabilité génétique de l'insert et à la stabilité phénotypique de la plante

L'hérédité de l'insert a été étudiée sur cinq générations d'autofécondation par (la technique de Southern. De plus, des analyses de ségrégation (présence du transgène détecté par PCR) de populations issues de croisement hétérozygotes, montrent que le transgène est transmis à la descendance comme un caractère mendélien dominant.

(7) Informations relatives aux effets toxiques, allergiques, et autres effets délétères pour la santé humaine et animale.

(7.1-3) Analyse comparative de la composition chimique

Les analyses de composition chimique ont été réalisées à partir d'échantillons de graines de colzas MON88302 et de ses équivalents non transgéniques, cultivés en 2009 sur 5 sites en Amérique du Nord (US et Canada -3 répétitions par site), et en 2009-2010 sur 4 sites au Chili (3 répétitions par site).

Les comparateurs sont le colza Ebony dont le fonds génétique est proche du MON88302 puisqu'il correspond à la lignée utilisée pour réaliser la transformation génétique et plusieurs variétés commerciales (7 et 13 respectivement dans les essais Nord et Sud américain). Sur chaque site, une partie des colzas MON88302 a été traitée avec le glyphosate au stade végétatif 4-5 feuilles, une autre partie n'a pas été traitée.

Les composés des graines entières de colzas mesurés et analysés correspondent à ceux recommandés par l'OCDE 2011², ils sont les suivants:

- les paramètres proximaux (cendre, humidité, protéines totales, hydrates de carbones lipides totales, fibres totales, fibres solubles dans des détergents acides et neutres)
- 9 minéraux et la vitamine E,
- 6 facteurs anti-nutritionnels majeurs: 3 glucosinolates (alkyl,indolyl et totaux), l'acide phytique, la sinapine ou l'acide sinapique suivant les lieux de culture et les tannins totaux.
- 18 acides aminés,
- 29 acides gras (C8-C24 incluant l'acide érucique)

L'analyse statistique n'a pas pu être appliquée pour environ 50% des acides gras et le sodium, car les valeurs obtenues étaient en dessous de la limite de quantification.

L'analyse statistique avait pour objectif de comparer les valeurs mesurées dans les colzas MON88302 (traités ou non traités) à celles mesurées dans l'équivalent non transgénique Ebony. Les valeurs extrêmes ont été identifiées et des tests de différence et d'équivalence ont été réalisés. Les tests d'équivalence sont basés sur les valeurs obtenues à partir des variétés commerciales. Les résultats des tests

² OECD 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. ENV/JM/MONO(2011)55.

statistiques ont été interprétés selon l'approche décrite par l'EFSA (2010). Ces résultats montrent que pour la majorité des variables, l'hypothèse de non-équivalence peut être rejetée. Pour deux variables (vitamine E et calcium), l'équivalence est plus probable que la non-équivalence. L'hypothèse de non-équivalence n'est acceptée pour aucune variable de composition.

En conclusion, les résultats de cette étude permettent de considérer que les graines de colza MON88302, traités ou non traités par le glyphosate, présentent une composition chimique équivalente à celles des graines des colzas Ebony, son témoin non transgénique.

Etant donné que ce colza a été développé pour résister à un traitement glyphosate tardif, il aurait été nécessaire de réaliser une analyse de composition sur du colza MON88302 traité tardivement et de fournir les teneurs résiduelles en glyphosate et ses métabolites dans les graines et l'huile.

(7.7) Utilisation et consommation prévue

Les protocoles de préparation des tourteaux et de l'huile à partir du MON88302 sont les mêmes que ceux utilisés pour les autres variétés de colza.

(7.8) Toxicologie

Evaluation de la sécurité des organismes donneurs et de la protéine

Le gène *cp4epsps* provient d'*Agrobacterium sp.* CP4, espèce non connue comme étant pathogène ou allergène pour l'Homme ou l'animal

La protéine CP4 EPSPS produite dans le colza MON88302 appartient à la famille des protéines EPSPS ubiquitaires dans la nature (algues, plantes, champignons, bactéries) à l'exception des animaux.

Elle est considérée comme étant similaire aux protéines naturellement présentes dans des aliments comme le soja ou le maïs, dans des champignons ou bactéries utilisés en agro-alimentaire (*Saccharomyces cerevisiae*) qui possèdent un historique de consommation sûre.

Cette forme de la protéine CP4EPSPS présente une affinité réduite pour le glyphosate, conférant à la plante son caractère de tolérance à l'herbicide.

Le gène *CP4epsps* a déjà été introduit par transformation dans des plantes cultivées (colza, soja, maïs, cotonnier, betterave) et la protéine CP4EPSPS a déjà été évaluée dans le cadre des demandes d'autorisation de mise sur le marché de ces plantes. Les plantes génétiquement modifiées, exprimant cette même protéine, sont autorisées et commercialisées, certaines depuis 1996, sans qu'aucun effet néfaste sur la santé des consommateurs n'ait été rapporté.

L'évaluation de la sécurité de la protéine CP4EPSPS comporte notamment une analyse bio-informatique nouvelle visant à comparer la séquence en acides aminés de cette protéine avec d'autres protéines connues comme étant toxiques ou allergéniques. Aucune homologie de séquence avec ces protéines n'est identifiée.

La toxicité par administration unique de la protéine CP4 EPSPS a été étudiée chez la souris CD1 des deux sexes (10 de chaque par groupe), à partir de la protéine produite par *E. coli*³. La dose maximale de 572 mg/kg p.c. est sans effet toxique.

³ L'équivalence entre la protéine CP4EPSPS produite dans *E. Coli*, ayant servi aux tests de toxicité et celle présente dans les graines de colza MON88302 a été vérifiée.

(7.8.4) *Etude de la toxicité sub-chronique*

Aucune étude n'est présentée. Le pétitionnaire considère que compte tenu des résultats de l'analyse comparée de composition (qui démontre que celle-ci n'est pas modifiée dans le colza MON88302) et de l'innocuité démontrée de la protéine nouvellement présente CP4EPSPS, il n'était pas nécessaire de conduire d'autres études.

Toutefois, l'objectif de l'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours n'étant pas de démontrer uniquement l'absence de toxicité de la protéine CP4EPSPS, mais surtout d'écarter le risque d'effets inattendus liés à l'insertion du transgène dans la matrice végétale, la seule documentation de la sécurité de la protéine est considérée par le CES comme insuffisante.

(7.9) *Allergénicité*

Le colza n'est pas considéré comme étant communément à l'origine d'allergie alimentaire. Le risque potentiel d'allergie dû à la protéine CP4EPSPS a été documenté en s'appuyant sur les recommandations du Codex Alimentarius (2009).

En particulier, la protéine CP4EPSPS :

- n'est pas connue pour présenter des similarités avec un adjuvant ;
- provient d'une source non connue pour être un allergène ;
- n'a pas de similitude structurelle avec des protéines allergènes sur la base de la séquence des acides aminés (analyse bio-informatique actualisée) ;
- ne représente qu'une faible proportion des protéines totales (0,01%) ;
- est rapidement dégradée *in vitro* en milieu digestif simulé ;
- est thermosensible or le tourteau est traité par la chaleur pour l'extraction de l'huile.

Il convient de noter que ces données ne suffisent pas pour autant à conclure de façon certaine à l'absence de potentiel allergénique, mais, qu'en l'état actuel des connaissances, une telle certitude ne pourrait être obtenue pour aucune protéine.

(7.10) *Evaluation nutritionnelle*

Le pétitionnaire considère que la composition chimique du colza MON 88302 est équivalente à celle de la variété isogénique et des variétés commercialisées. Etant donné la nature de la modification génétique qui conduit à l'expression d'une protéine n'ayant pas d'impact connue sur la qualité nutritionnelle de la plante, dans laquelle elle est exprimée, le pétitionnaire considère qu'il n'est pas nécessaire de réaliser une étude d'alimentarité.

Aucune étude n'est présentée.

Conclusion du CES Biotechnologie

Les colzas MON88302 ont été génétiquement modifiés pour introduire dans leur génome le gène CP4epsps dont l'expression lui confère la tolérance au glyphosate.

L'analyse moléculaire a été réalisée et son évaluation permet de caractériser l'insertion dans le génome de colza et de conclure à la stabilité génomique et d'expression du transgène. Les analyses bio-informatiques à partir des bases de données (toxines/allergènes et séquence du génome de colza) actualisées en 2011, ne font pas apparaître de risques nouveaux. **Toutefois, en raison de la nature du promoteur, il est nécessaire de disposer d'information sur le niveau d'expression du transgène dans le pollen.**

L'analyse comparée de composition chimique permet de conclure que le colza MON 88302 a une composition chimique équivalente à celle du colza témoin non transgénique et à celles d'autres variétés destinées à l'alimentation animale et humaine. **Cependant, il aurait été nécessaire de réaliser une étude de composition comparée sur du colza**

traité en post floraison et de fournir les teneurs résiduelles en glyphosate et ses métabolites dans les graines et l'huile.

Compte tenu des conditions de réalisation de l'analyse de composition (avec un traitement glyphosate précoce) et en absence de test d'alimentarité, il n'est pas possible de conclure strictement à une équivalence nutritionnelle avec le colza témoin non transgénique.

Au vu des données disponibles, en particulier, l'historique d'expression de la protéine CP4EPSPS dans les plantes génétiquement modifiées, il est peu probable que la consommation de colza MON 88302 expose le consommateur de tourteau ou d'huile à un quelconque risque sanitaire.

Toutefois, l'absence d'une étude de toxicité sub-chronique avec l'aliment pendant 90 jours chez les rongeurs et d'un test d'efficacité alimentaire chez les animaux cibles, ne permet pas d'apprécier totalement le risque potentiel lié à la consommation de produits alimentaires issus des colzas MON88302.

Par conséquent, le CES ne peut conclure quant à la sécurité sanitaire liée à la consommation des colzas MON88302 et de leurs produits dérivés.

4. CONCLUSIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions du Comité d'Experts spécialisé « Biotechnologie ».

Sur la base du dossier initial disponible dans les délais prévus, l'Agence émet un avis défavorable à la demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du règlement (CE) n°1829/2003, du colza génétiquement modifié MON88302, développé pour être tolérant à un herbicide, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM.

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

OGM, colza, MON88302, tolérance au glyphosate, CP4EPSPS.