

Maisons-Alfort, le 25 juin 2008

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la demande de renouvellement de l'autorisation de mise sur le marché des colzas génétiquement modifiés MS8, RF3 et MS8xRF3, tolérant au glufosinate d'ammonium, pour l'utilisation en alimentation humaine et animale de produits dérivés, au titre du règlement (CE) n°1829/2003.

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) a été saisie le 15 avril 2008 par la Direction générale de concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis relatif à la demande de renouvellement de l'autorisation de mise sur le marché des colzas génétiquement modifiés MS8, RF3 et MS8xRF3, tolérant au glufosinate d'ammonium, pour l'utilisation en alimentation humaine et animale de produits dérivés, au titre du règlement (CE) n°1829/2003 (EFSA-GMO-RX-MS8/RF3).

Conformément à ce règlement, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESAs) est chargée de procéder à l'évaluation des dossiers concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, génétiquement modifiés et de rendre un avis à la Commission européenne. L'AESA a cependant décidé de permettre aux Etats-membres de faire connaître leurs observations sur le dossier initial. C'est dans le cadre de cette procédure que la DGCCRF a sollicité l'avis de l'AFSSA.

Historique des évaluations et autorisations

Les variétés de colza portant les événements de transformation MS8, RF3 et MS8xRF3 ont été évaluées pour la première fois en 1996 pour une demande d'autorisation de mise sur le marché au titre de la directive 90/220/EEC. Examiné par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, le dossier avait reçu un avis défavorable considérant que l'équivalence en substance était mal établie et qu'il aurait été nécessaire de disposer d'au moins une étude sur animaux de ferme nourris avec ce colza transgénique.

L'AFSSA a été saisi une première fois en avril 2004 au titre de la directive 2001/18, l'agence avait alors conclu que pour évaluer la sécurité sanitaire du colza portant les événements de transformation MS8 et RF3, il conviendrait de disposer :

- d'une étude d'alimentarité chez le poulet
- d'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.

Suite à l'apport de compléments d'informations, l'AFSSA a été saisie de nouveau et a rendu un avis défavorable le 18 novembre 2004 considérant que les compléments fournis ne permettaient toujours pas de statuer sur la sécurité sanitaire des colzas génétiquement modifiés MS8xRF3.

Par ailleurs, l'huile 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. De même, l'utilisation pour l'alimentation animale des colzas génétiquement modifiés MS8, RF3 et MS8xRF3 et de leurs produits dérivés au titre de la directive 2001/18 a été autorisée par la commission européenne le 26 mars 2007.

En accord avec les articles 11 et 23 du règlement CE N°1829/2003, la présente demande vise à renouveler les autorisations des produits existants avant une période maximale de 10 ans suivant la date de première autorisation. Il s'agit de : l'huile de colza autorisée depuis 1999 en alimentation humaine, des additifs et arômes destinés à l'alimentation humaine, des produits dérivés destinés à l'alimentation animale.

L'évaluation des caractéristiques génétiques des inserts MS8 et RF3 a été conduite en 2004 à deux reprises (saisine 2004-SA-0152 et 2004-SA-0374) et est décrite dans l'avis du 13 mai 2004. Le présent avis se limitera à la prise en compte des nouvelles analyses de la composition chimique, de l'étude chez le poulet visant à montrer l'équivalence nutritionnelle et des études concernant l'évaluation des risques toxicologiques et d'allergénicité de la plante génétiquement modifiée.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 19 juin 2008, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant :

Information générale

Le colza hybride MS8xRF3 associe un parent mâle stérile (MS8) porteur du gène *barnase* codant une ribonucléase, à une autre lignée RF3 qui restaure la fertilité grâce au gène *barstar* codant un inhibiteur de la ribonucléase. Les deux événements portent le gène marqueur *bar* codant la protéine PAT qui confère la tolérance au glufosinate d'ammonium.

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

- une stérilité mâle (MS) assurée par l'expression spécifique 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 dont l'expression est exclusive dans les cellules ciblées, ce gène est associé à un marqueur de sélection (gène *bar*) conférant la tolérance à une molécule herbicide (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 aussi associé au gène *bar* conférant cette même tolérance au glufosinate d'ammonium.

Les plantes hybrides 100% fertiles et résistantes 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.

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

(3) Informations relatives à l'expression des produits des transgènes

Ces données sont rappelées car elles sont importantes dans la prise en compte du risque toxicologique.

Des expériences de Western ont montré que la protéine PAT est détectée dans les feuilles, les racines, les boutons floraux, le pollen et les graines à maturité, alors que les protéines Barnase et Barstar ne sont détectées que dans les boutons floraux.

Les teneurs en protéine PAT, mesurées par ELISA, sont très faibles. Les valeurs dans les graines varient entre 0,07 et 0,31 µg/g de graines, ce qui représente moins de 0,001% des protéines totales des graines.

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

(7.1.3) Les compositions chimiques ont été déterminées à partir de graines de colza hybride F1 MS8xRF3, cultivés sur 12 sites en Belgique au cours des saisons 2001 et 2002 (4 répétitions par site), et comparées à celles d'échantillons provenant d'un colza témoin non transgénique ainsi qu'aux données standard de variétés commerciales. 144 échantillons ont été analysés sur 70 composés chimiques.

Deux types de traitement ont été appliqués aux cultures :

- un herbicide conventionnel pour le colza témoin non transgénique et pour le colza MS8xRF3
- le glufosinate d'ammonium pour le colza MS8/RF3.

L'analyse a porté sur les composés suivants de la graine :

- paramètres proximaux (eau, lipides, protéines, cendres, hydrates de carbonés, fibres solubles dans des détergents acides et neutres).
- 9 minéraux,
- 4 tocophérols,
- 5 facteurs anti-nutritionnels,
- 18 acides aminés,
- 13 acides gras.

Les concentrations moyennes des composants chimiques recommandés¹ ont été calculées par site et tous sites confondus. Puis, les valeurs des colzas MS8xRF3 traités ou non au glufosinate ont été comparées statistiquement² à celles des colzas témoins. Cette analyse montre une concentration légèrement supérieure en alkényl glucosinolates du colza MS8xRF3 par rapport au colza témoin influant sur la teneur globale en glucosinolates. Cependant, ces concentrations moyennes (15,8 µmoles/g) sont très inférieures à la teneur maximale standard publiée par l'OCDE¹ (33,9 µmoles/g) en glucosinolates totaux. Pour tous les autres composés, aucune différence n'est observée entre les variétés de colza.

(7.5) **Spécificité des produits**

Les produits dérivés du colza sont essentiellement issus de la graine. Son huile est utilisée en alimentation humaine (exceptionnellement en alimentation animale) et le tourteau déshuilé est destiné à l'alimentation animale.

La quantité de protéine PAT dans différentes fractions après transformation industrielle a été déterminée par ELISA. Elle est faible dans les premières fractions et indétectable dans les suivantes (dont l'huile).

(7.8) **Toxicologie**

Evaluation de la sécurité des organismes donneurs

Streptomyces hygroscopicus est à l'origine du gène *pat* et *Bacillus amyloquefaciens* à l'origine des gènes *barnase* et *barstar*. Ce sont des bactéries saprophytes du sol, non pathogènes pour l'Homme et l'animal.

Evaluation de la sécurité des protéines PAT, Barnase et Barstar

Les protéines Barnase et Barstar ont fait l'objet de nombreuses études démontrant l'absence de toxicité et d'allergénicité. Ces protéines ne sont exprimées que dans les bourgeons floraux et sont absentes des graines et des produits dérivés tels que l'huile et le tourteau.

Concernant la sécurité de la protéine PAT, les éléments suivants sont pris en compte :

- la protéine PAT ne présente pas d'homologie avec des toxines connues,
- la protéine PAT ne possède pas de site de glycosylation,
- l'action de la protéine PAT est très spécifique de son substrat L-phosphinothricine et n'acétyle pas les autres L-acides aminés,
- l'enzyme PAT est inactive après un traitement à 50°C.

La protéine PAT est rapidement dégradée en milieu gastrique simulé (30 secondes en présence de pepsine à pH 2), de même qu'en milieu intestinal simulé en présence de pancréatine (5 minutes à pH 7,5). Ces données démontrent que la protéine PAT est fortement instable en milieu gastrique et intestinal.

Une étude de toxicologie aiguë de la protéine PAT produite par *E. coli* (pureté 95%), administrée par voie intraveineuse chez la souris aux doses de 1 et 10 mg/kg de poids

¹ OCDE 2001, Consensus document on key nutrients and key toxicants in low erucic acid rapeseed (canola), Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 1

² Hothorn et Oberdörfer, 2006 Statistical analysis used in the nutritional assessment of novel food using the proof of safety, Regul. Tox. and Pharmacol., 44, 125-135.

corporel, a été réalisée. Aucune létalité et aucun signe clinique particulier ne sont observés chez les animaux suivis pendant 14 jours.

Cette même protéine a fait l'objet d'une seconde étude via l'aliment, par administration répétée, pendant 14 jours consécutifs, à 2 groupes de rats aux doses de 0,71 et de 7,6 g/kg p.c. chez le mâle et de 0,7 et de 7,96 g/kg p.c. chez la femelle. Aucun effet lié au traitement ayant une signification toxicologique n'a été observé par rapport au groupe d'animaux soumis à un régime dont la teneur en protéines est équivalente.

(7.8.2) Etude de la toxicité sub-chronique

Aucune étude de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rat avec l'aliment n'a été réalisée.

(7.9) Allergénicité

L'évaluation de l'allergénicité repose sur les éléments suivants :

- ✓ les organismes donneurs des protéines ne sont pas connus pour être à l'origine d'allergène ;
- ✓ les protéines Barnase et Barstar ne sont exprimées que dans les bourgeons floraux ;
- ✓ la recherche d'identité de séquence des acides aminés de la protéine PAT (comparaison de séquences de 80 acides aminés et recherche de 8 acides aminés contigus) avec des séquences de protéines connues pour être allergènes n'a pas mis en évidence de telles identités ;
- ✓ la protéine PAT est sensible à la protéolyse en milieu acide (fluide gastrique simulé) et neutre (fluide intestinal simulés) ;
- ✓ l'absence de site de glycosylation dans la séquence de PAT ;
- ✓ la faible teneur en protéine PAT dans les graines de colza.

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

(7.10) Evaluation nutritionnelle

Une étude d'alimentarité réalisée chez le poulet en 2004 apporte de nouveaux éléments. Cette étude a utilisé 420 poulets mâles et femelles (140 par traitement, 3 traitements) nourris pendant 42 jours avec trois régimes successifs (démarrage, croissance et finition) contenant tous 10% de graines broyées de colza conventionnel ou de colza portant les événements MS8 et RF3 traité ou non au glufosinate d'ammonium. Les animaux nourris avec le colza portant les événements MS8 et RF3 traité ou non sont comparés à ceux nourris dans les mêmes conditions avec le colza témoin.

La composition chimique des graines provenant des différentes variétés testées a été vérifiée pour la teneur en eau, protéines, lipides, cendres, fibres, lignine, hydrates de carbones, acides aminés (18), tocophérols et en minéraux (8). De même, les teneurs en métaux lourds, en mycotoxines et en pesticides ont été déterminées. La teneur en facteurs anti-nutritionnels a également été vérifiée (acide érucique, acide phytique et glucosinolates).

Au cours de l'expérience, les observations ont porté sur la santé globale des animaux, la croissance, la quantité de nourriture absorbée et l'efficacité alimentaire. En fin de traitement, 126 animaux choisis au hasard dans les 3 groupes ont été sacrifiés pour mesurer le rendement et le poids de 6 morceaux de découpe. Le taux de mortalité est élevé dans tous les groupes (y compris les témoins) en raison de la survenue d'un stress thermique au cours de l'expérimentation, cependant ce fait ne remet pas en cause la recevabilité de l'étude.

L'analyse statistique (ANOVA) ne met en évidence aucune différence liée au type de traitement pour l'ensemble des observations décrites ci-dessus. Cette nouvelle étude permet donc de conclure à l'équivalence nutritionnelle entre les colzas portant les événements MS8 et RF3 traités ou non traités et les colzas conventionnels.

Conclusion de l'Agence Française de Sécurité des Aliments:

Le présent dossier de renouvellement comporte une mise à jour des données et des études complémentaires. Ces études sont notamment:

- ✓ une analyse statistique des données de composition chimique permettant de conclure à l'équivalence substantielle des colzas portant les événements MS8 et RF3 avec leurs témoins non transgéniques
- ✓ une évaluation toxicologique montrant l'absence de risque consécutif à l'ingestion de la protéine PAT (recherche d'homologie avec des toxines et allergènes, étude de toxicité par administration répétée voie orale de la protéine PAT)
- ✓ une étude d'alimentarité chez le poulet permettant de conclure à l'équivalence nutritionnelle du colza portant les événements de transformation MS8 et RF3 avec son témoin non transgénique

Compte tenu de ces nouvelles données et de l'absence de signalement d'effets néfastes depuis plus de 10 ans de culture (21 millions de tonnes cultivés au Canada entre 2000 et 2006) et de consommation (mise sur le marché pour l'alimentation animale en 1996 au Canada), l'Agence Française de Sécurité des Aliments estime que les colzas portant les événements de transformation MS8 et RF3 présentent le même niveau de sécurité sanitaire que les variétés de colza conventionnelles et leurs produits dérivés.

Mots clés : OGM, renouvellement, colza MS8 RF3 et MS8xRF3, tolérance au glufosinate.

La Directrice Générale

Pascale BRIAND