

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 27 février 2013

## **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 73496 développé afin d'être tolérant au glyphosate, 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 30 octobre 2012, par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF), d'une demande d'avis concernant l'autorisation de mise sur le marché au titre du règlement CE n°1829/2003, du colza génétiquement modifié 73496, développé afin d'être tolérant au glyphosate, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n°**EFSA-NL-2012-109**).

#### **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 Groupe de Travail (GT) "Biotechnologie", réuni le 21 février 2013. L'évaluation du dossier se base sur les lignes directrices de l'EFSA<sup>1</sup> et sur les éléments complémentaires jugés nécessaires par les experts du GT Biotechnologie.

### 3. ANALYSE DU GT

#### Information générale

Le dossier correspond à une première demande d'autorisation de mise sur le marché pour l'alimentation humaine et animale du colza génétiquement modifié 73496 et de ses produits dérivés; elle ne concerne pas sa mise en culture.

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'agro-carburant et d'huile alimentaire (dont la teneur dans les graines est d'environ 40 à 45 %).

Le colza 73496 a été transformé pour y introduire le gène *gat4621* qui code la glyphosate N-acétyl-transférase 4621 (GAT4621). Le colza 73496 peut, grâce à l'action de la protéine GAT4621 acétyler le glyphosate, le rendant ainsi non-phytotoxique.

Il convient de rappeler que ce colza, s'il venait à être importé devrait satisfaire à la réglementation relative à l'utilisation des herbicides. En raison de l'acétylation du glyphosate dans les colzas 73496, cet usage devra être évalué par les instances européennes compétentes avant l'autorisation de mise sur le marché des colzas 73496.

#### A. Identification et caractérisation du danger

##### A.1 Information relative à l'organisme récepteur ou (le cas échéant) la plante parentale.

La lignée notée 1822B a été choisie pour ses aptitudes à la transformation génétique et pour son utilisation en production et sa commercialisation. C'est l'haploïde doublé de cette lignée 1822B qui a été utilisé comme récepteur pour l'obtention de l'évènement de transformation 73496.

##### A.2 Caractérisation moléculaire

###### A.2.1 Information relative à la modification génétique.

###### A.2.1.1 Description des méthodes utilisées pour créer la modification génétique

La transformation a été réalisée sur des microspores de la lignée 1822B par bombardement de particules (biolistique) enrobées de la construction linéaire, portant la cassette d'expression d'intérêt.

Préalablement à la transformation, le plasmide contenant la cassette d'expression a donc été soumis à une restriction par les enzymes *HindIII/NotI* afin de libérer un fragment de 2112 pb, portant la cassette d'expression d'intérêt.

<sup>1</sup>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 sélection des événements de transformation a été réalisée par un traitement au glyphosate tout au long du processus de régénération permettant l'obtention des plantes T0. Parmi les plantes ainsi sélectionnées et leur descendance, l'évènement 73496 a été retenu pour la présente demande d'autorisation.

#### A.2.1.2 Source et caractérisation des acides nucléiques utilisés pour la transformation.

La cassette d'expression insérée dans l'évènement de transformation 73496 est constituée :

- du promoteur constitutif du gène de la polyubiquitine UBQ10 d'*Arabidopsis thaliana*
- la séquence « optimisée » issue de la séquence codante du gène *gat4621* de *B. licheniformis* (une bactérie utilisée pour la production d'enzymes destinées à l'industrie alimentaire). La version optimisée de ce gène code pour une protéine de 147 acides aminés qui partage près de 80% d'homologie de séquence protéique avec les différentes formes natives.
- le terminateur de transcription du gène *pinII* de la protéinase II de la pomme de terre.

De courtes séquences ayant permis le clonage des éléments précédents sont aussi présentes.

#### A.2.1.3 Nature et source du vecteur utilisé incluant les séquences nucléiques destinées à être insérées.

Le plasmide utilisé est un vecteur simple dérivé de M13 et pBR322. Il contient entre autre l'origine de réplication *colE1*, le gène de sélection bactérien *bla* conférant la résistance bactérienne à l'ampicilline, ainsi que la cassette d'expression du gène *gat4621*.

### A.2.2 Information relative à la plante GM

#### A.2.2.1 Description générale du caractère introduit

L'enzyme GAT4621 est une glyphosate acétyl-transférase (GAT) qui métabolise le glyphosate en un dérivé N-acétylé non phytotoxique, conférant ainsi la tolérance à l'herbicide. La protéine GAT4621, une version optimisée, possède une activité sur le glyphosate 7000 fois supérieure aux protéines natives. Cette protéine synthétique a déjà été exprimée dans le maïs 98140. Ce dernier a été expertisé par l'AFSSA en 2008 (saisine 2008-SA-0357) et est en cours d'évaluation à l'EFSA.

La protéine GAT4621 acétyle une large gamme de substrats. Lors de l'examen du maïs 98140 par l'AFSSA en 2008, il avait été observé des teneurs élevées en acides-aminés acétylés tels que l'acide aspartique, l'acide glutamique, la sérine, la thréonine.

#### A.2.2.2 Information sur les séquences effectivement insérées/supprimées ou altérées.

Des hybridations de type Southern ont été réalisées sur 2 profils de restrictions avec 6 sondes couvrant chaque élément de la cassette d'expression et du plasmide de clonage.

Ces hybridations ont porté sur l'ADN génomique extrait de feuilles provenant :

- de plantes transgéniques homozygotes 73496 ;
- de plantes témoins non GM comme contrôle négatif ;
- du plasmide PHP28181 comme contrôle positif.

L'analyse des profils d'hybridation montre une insertion complète et unique du fragment. Chaque élément constituant la cassette d'expression est retrouvé dans l'évènement de transformation 73496. Aucun signal n'est obtenu avec des sondes spécifiques du plasmide de clonage situées en dehors de la cassette GAT4621 indiquant l'absence de ces séquences dans le génome.

La construction insérée dans l'évènement 73496 a été entièrement séquencée sur 6150 pb, incluant 2003 pb de la bordure 5' de l'insert, les 2109 pb de la cassette d'expression et 2038 pb de la bordure 3' de l'insert. Le fragment initial complet de 2112 pb a été inséré à l'exception des 3 premiers nucléotides en 5' ; aucun changement de nucléotides n'est observé dans la cassette d'expression.

Les séquences de l'évènement 73496, adjacentes en 5' et en 3' de l'insertion, correspondent bien à du génome nucléaire du colza. Cependant aucune information n'est fournie concernant la comparaison de cette séquence en regard de la lignée conventionnelle parentale 1822B. En effet, une amplification et un séquençage de l'ADN de la lignée non-transgénique auraient permis de vérifier que :

- les bordures 5' et 3' sont contigües et sans réarrangement ;
- des insertions ou des délétions de nucléotides du génome de la plante au site d'insertion ne se sont pas produites ;

Une analyse bioinformatique de la séquence du génome de la plante en 3' de l'insertion ne présente aucune séquence codante et/ou de fonction connue correspondant à un gène. L'analyse bioinformatique de la région en 5' de l'insertion, présente une région codante (en amont du transgène et dans l'orientation sens) ayant une homologie avec celles des gènes de la famille des *tpt* (triose phosphate translocator).

La recherche d'autres cadres ouverts de lecture (ORF) a été réalisée sur l'ensemble de la région d'insertion, la cassette d'expression et les séquences flanquantes. 145 ORF potentielles, présentant un cadre de lecture d'au moins 8 acides aminés, ont été identifiées. Aucune de ces ORF ne présente d'homologie significative avec des toxines ou des allergènes connus. Par ailleurs, une analyse a été réalisée pour s'assurer qu'aucune nouvelle séquence créée par l'insertion ne pouvait donner lieu à la synthèse d'une protéine présentant une homologie avec ces séquences. Neuf ORFs putatives ont été identifiées : 3 à la jonction 5' entre le génome et le transgène et 6 à la jonction 3'. Comparées aux séquences répertoriées dans les bases de données d'allergènes et de toxines, aucune de ces ORF ne présente d'homologie significative avec des toxines ou des allergènes connus.

#### A.2.2.3 Information sur l'expression des séquences modifiées ou insérées

Les teneurs en protéine GAT4621 ont été mesurées par des tests ELISA dans la plante entière à différents stades du développement, dans les racines et dans les graines. Les échantillons proviennent de plantes cultivées au champ en 2010, sur 9 sites répartis en Amérique du nord. Les colzas 73496 ont été traités soit par le glyphosate (GT), soit par un autre herbicide (CHT).

La protéine GAT4621 a été détectée dans tous les tissus des plantes transgéniques, traitées ou non par l'herbicide (cf. tableau 1). Les valeurs des concentrations de GAT4621 sont comparables dans les échantillons traités par le glyphosate ou par l'autre herbicide.

**Tableau 1** : Concentrations de protéine GAT4621 ( $\mu\text{g/g}$  de poids sec) dans la plante entière, les racines et les graines de colza 73496 (essai Amérique du Nord 2010).

	Colza 73496 CHT*	Colza 73496 GT**
Plante entière (floraison***)	8,1 (6,0-13)	8,2 (6,0-12)
Racines (floraison)	4,2 (1,6-7,5)	4,4 (1,7-8,7)
Graines (sénescence)	5,6 (3,6-8,1)	5,6 (4,2-8,7)

\*traitement herbicide conventionnel

\*\*traitement glyphosate

\*\*\*stade de développement

#### **Analyse de l'expression du gène endogène *tpt* du colza**

Une étude bioinformatique utilisant les séquences de colza des bases de données (*Brassica nap*a, un des 2 parents du colza et les EST de colza) démontre un alignement de la séquence en 5' bordant l'insertion avec quatre exons d'un gène annoté « Triose phosphate/phosphate translocator, chloroplast precursor (TPT) ».

Des analyses par Southern blot ont permis de montrer que 3 à 4 copies de gènes *tpt* sont présentes dans le génome du colza. L'expression de ces gènes a été étudiée par Northern blot à partir d'ARN extraits des feuilles et des graines. Un signal d'hybridation avec une sonde correspondant aux 3 exons du gène de la bordure 5' de l'insertion est détecté dans les feuilles du témoin et du colza 73496 alors qu'aucune expression n'est détectée dans les graines.

Les PCR quantitatives, plus sensibles, réalisées sur feuilles et graines en développement montrent que l'expression spécifique du gène *tpt* prédit en 5' de l'insertion a une expression diminuée de 7 fois dans le colza transgénique par rapport au témoin. Toutefois l'expression des gènes *tpt* dans leur ensemble n'est diminuée que de 50%. Une forte variabilité d'expression de cette famille de gènes est observée naturellement (1,6 fois). Aucun phénotype en lien avec la fonction de ces gènes n'est observé. Des travaux publiés en 2011 montrent que des mutants de ce gène (unique chez *Arabidopsis*) n'ont pas d'impact sur la croissance ou/et l'activité photosynthétique. Sachant que la lignée commercialisée sera un hybride, le pétitionnaire suggère que la différence d'expression n'aura pas d'impact sur le phénotype.

#### A.2.2.4 Stabilité génétique de la séquence insérée ou modifiée et stabilité phénotypique de la plante GM.

La stabilité de l'insertion portant le gène de tolérance à l'herbicide a été vérifiée sur plusieurs générations et croisements, par des analyses de type Southern ainsi que par l'étude de la ségrégation du caractère d'intérêt agronomique.

Le caractère de résistance à l'herbicide se comporte comme un caractère unique et dominant qui s'hérite de façon mendélienne.

#### A.2.3 Conclusion

Le colza transgénique 73496 a été obtenu par la technique de transformation directe par bombardement de particules. Le fragment d'ADN linéaire est intégré en une copie à un seul locus et comporte les éléments de la cassette d'expression du gène *gat4621*. Le séquençage des régions du génome de la plante adjacentes à l'insertion a été réalisé sur plus de 2000 nucléotides à chaque extrémité. Elles correspondent bien à du génome de colza. La comparaison des séquences au niveau du site d'insertion dans la lignée de départ et dans la lignée transgénique n'est pas fournie. Une analyse plus précise du site d'insertion avant et après l'insertion est nécessaire pour une complète caractérisation de l'événement.

Une analyse bioinformatique a été réalisée et montre que la fusion entre les régions adjacentes du génome de la plante et l'insert ne crée pas de nouvelles ORFs ayant des homologues avec des séquences d'allergènes et de toxines.

Dans la région 5' adjacente, une région codante (4 exons) a été identifiée, ces exons codent une « triose phosphate/phosphate translocator » (TPT). L'expression de ce gène est diminuée dans la lignée transformée 73496 par rapport à celle de la lignée de référence sans qu'aucun phénotype ne soit mis en évidence.

Les niveaux d'expression de la GAT4621 ont été mesurés sur différents organes, à différents stades du développement de la plante. Le niveau d'expression de la GAT4621 est le même quelque soit le traitement herbicide appliqué.

La stabilité de l'insertion portant le gène de tolérance au glyphosate a été vérifiée sur plusieurs générations et croisements.

### A.3 Evaluation comparative

#### A.3.1 Critères de sélection des comparateurs

Pour des raisons techniques, la lignée réceptrice de la modification génétique est une lignée élite mâle stérile. Cette lignée a été croisée avec une lignée de même fonds génétique (1822), restaurant la fertilité. Le colza génétiquement modifié utilisé dans cette étude est un colza hybride, résultat du croisement de deux lignées élite dont la 1822GM. Le colza témoin choisi comme comparateur est aussi un hybride, résultat du croisement de deux lignées élite de fonds génétiques proches des deux précédentes mais non génétiquement modifiées. Dans cette analyse de composition, le colza 73496 a été comparé au comparateur et à 6 variétés commerciales de référence.

#### A.3.2 Expérimentation en champs : dispositif expérimental et analyse statistique

##### A.3.2.1 Dispositif expérimental

Le colza 73496 et son comparateur ont été cultivés sur 9 sites de production (5 au Canada et 4 aux Etats-Unis) en 2010, en blocs de 4 répétitions. L'hybride transgénique a été cultivé sur chaque site avec deux modalités de traitement herbicide : un traitement conventionnel (autre que le glyphosate, que nous appellerons CHT) et avec un traitement glyphosate (GT). Le comparateur et les variétés commerciales ont reçu un traitement conventionnel (CHT). Les caractéristiques du plan d'expérience respectent les recommandations de l'EFSA.

##### A.3.2.2 Analyse statistique

Le colza génétiquement modifié (traité par l'autre herbicide ou par le glyphosate) est comparé au contrôle non transgénique par des tests de différence et d'équivalence, se basant sur les valeurs obtenues à partir des variétés commerciales pour ce dernier test.

Une ANOVA globale a été réalisée avec un modèle linéaire mixte incluant un effet fixe « génotype » et un effet aléatoire « variété commerciale » mais aussi « site », « bloc dans site » et « interaction site\*génotype ». Le modèle correspond à celui proposé par l'EFSA. L'erreur de type 1 retenue pour les tests de différence est de 10%.

Les tests d'équivalence consistent à comparer la composition du colza transgénique aux gammes calculées pour les variétés commerciales incluses dans l'expérimentation.

Lorsque les variances estimées pour les variétés commerciales sont beaucoup plus petites que celles estimées pour les sites, il n'est pas possible de conclure au test d'équivalence, le pétitionnaire calcule donc des intervalles de tolérance à partir de données de variétés commerciales externes à l'essai de 2010.

Les résultats des tests statistiques ont été interprétés selon l'approche décrite par l'EFSA (2010) en classant les variables en IV catégories et 8 sous-catégories selon la combinaison des résultats du test d'équivalence et de différence. Une catégorie a été ajoutée correspondant aux cas où il n'a pas été possible de conclure sur le test d'équivalence.

##### A.3.3 Analyse de composition

L'analyse de composition chimique a porté sur la graine pour un ensemble de paramètres proximaux (protéines, lipides, hydrates de carbone, cendres, fibres totales, ADF, NDF) et de composés des graines dont notamment 31 acides gras, 18 acides aminés, 9 minéraux, 10 vitamines, 14 glucosinolates, 9 métabolites secondaires et facteurs antinutritionnels ainsi que 5 acides aminés acétylés [le N-acétyl aspartate (NAA), le N-acétyl glutamate (NAG), la N-acétyl thréonine (NAT), la N-acétyl sérine (NAS) et la N-acétyl glycine (NAGly)]. Le choix des composés analysés suit les recommandations de l'OCDE (OCDE 2011<sup>2</sup>).

---

<sup>2</sup> OECD ENV/JM/MONO(2011)55 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  
<http://www.oecd.org/science/biotrack/49343153.pdf>

Pour la majorité des variables, l'hypothèse de non-équivalence peut être rejetée ; les teneurs mesurées dans le colza 73496 pour ces composés sont donc équivalentes à celles mesurées dans les colzas comparateurs.

Parmi les composés pour lesquels la non équivalence ne peut pas être rejetée (ou est plus probable que l'équivalence) :

- les cendres, les acides gras totaux, le brassicacrol et les fibres présentent des différences faibles entre le colza 73496 et le comparateur.
- les teneurs en acides aminés acétylés NAA, NAG, NAT sont nettement plus élevées dans les graines de colza 73496 que dans celles du colza comparateur (tableau 2) en raison de la présence de la protéine GAT4621. Les concentrations en acides aminés correspondant restent stables.

**Tableau 2** : Teneurs en acides aminés acétylés dans les graines de colza 73496 et comparateur en µg/g de poids sec

	comparateur	73496	73496
		CHT	GT
NAA	3,41	1860*	1710*
NAG	0,832	27,3*	29,3*
NAT	0,25	0,97*	0,89*
NAS	1,80	1,82	1,74
NAGly	0,158	0,143	0,135

\* différence significative à 0,01%

Pour certains composés, le test d'équivalence ne permet pas de conclure. Des intervalles de tolérance ont alors été calculés. Sur la base de ceux-ci, le colza **73496 CHT** apparaît non équivalent aux variétés commerciales pour la *cystine* et le *fer*. Toutefois, il n'est pas observé de différence avec le contrôle pour ces paramètres.

Six composés (fibres brutes, NDF, magnésium, vitamine B6, 4-hydroxybrassicine et acide phytique) pour lesquels il n'est pas possible de conclure au test d'équivalence présentent une différence significative entre le colza transgénique et le comparateur. Toutefois, les différences sont faibles (< 10%), à l'exception du glucosinolate 4-hydroxybrassicine pour lequel il existe une grande variabilité et dont les teneurs moyennes sont très inférieures à la teneur maximale observée.

Peu de différences sont observées dans les résultats entre les échantillons issus des colzas traités avec le glyphosate ou avec les autres herbicides. Le traitement n'a pas d'influence sur les résultats de composition chimique.

#### A.3.4 Caractéristiques agronomiques et phénotypiques

Les caractéristiques agronomiques et phénotypiques ont été évaluées sur 12 paramètres. Pour tous ces paramètres, l'hypothèse de non équivalence a été rejetée. Le colza transgénique 73496 traité par le glyphosate ou par un autre herbicide est donc équivalent au colza comparateur et aux variétés commerciales pour ses caractéristiques agronomiques et phénotypiques, à l'exception de la résistance à l'herbicide glyphosate.

#### A.3.5 Effets de la transformation de la plante en sous-produits

Les composés précédents mesurés dans les graines (sans les acides gras) ont également été mesurés dans le tourteau issu de colza 73496 et de colza comparateur. De même, l'huile blanchie et raffinée a été analysée pour 5 vitamines et 30 acides gras. Enfin les teneurs en NAA et NAG et GAT 4621 ont été mesurées dans les tourteaux et l'huile.

La concentration de NAA dans le tourteau est comprise entre 3100-3700 µg/g soit 220 fois supérieure à la concentration dans le tourteau issu du colza comparateur. La concentration de NAG est comprise entre 60 et 63 µg/g soit 30 fois supérieure à la concentration dans le tourteau issu du colza comparateur. Les concentrations de NAA, NAG et GAT4621 sont en dessous de la limite de détection dans l'huile. La teneur en  $\gamma$ -tocophérol est supérieure de 20% dans l'huile produite à partir de colza 73496 mais reste très inférieure à la gamme standard définie par l'OCDE pour des huiles de variété de colza considérée comme « faible en acide érucique ».

#### A.3.6 Conclusion

La composition chimique de la graine et du tourteau issus du colza 73496 traité ou non avec le glyphosate est différente de celles des graines et du tourteau issu du colza comparateur et des variétés commerciales.

Une augmentation significative de la teneur en acides aminés acétylés NAA et NAG, et dans une moindre mesure NAT est observée dans le colza 73496 par rapport au colza comparateur et aux variétés commerciales. Cette observation est en lien avec la fonction d'acétylation de la protéine GAT4621, exprimée par le transgène.

Etant donné l'activité acétyl-transférase sur le glyphosate de la protéine GAT4621, produit du transgène, les teneurs en glyphosate, N-acétyl glyphosate et en acide amino méthyl phosphonique (AMPA) et N-acétyl AMPA auraient dû être mesurées, en particulier dans les graines et les produits dérivés destinés à l'alimentation humaine et animale.

### A.4 Evaluation toxicologique

#### A.4.1 Lignes directrices normalisées des tests de toxicité

La toxicité potentielle du colza 73496 a été évaluée par des tests sur :

- 1) la protéine nouvellement exprimée GAT4621 ;
- 2) les acides aminés acétylés N-acétyl-aspartate (NAA), N-acétyl-glutamate (NAG), N-acétyl-thréonine (NAT), en raison de l'augmentation de leur concentration dans le colza 73496 par rapport au colza conventionnel ;
- 3) l'aliment entier préparé à partir du colza 73496 ;

Les études ont été menées dans quatre laboratoires BPL et suivent les protocoles de l'OCDE, de l'agence pour la protection de l'environnement américaine (US-EPA) et du ministère de l'agriculture, des forêts et de la pêche du Japon.

#### A.4.2 Evaluation des protéines nouvellement produites

La seule protéine nouvellement produite dans le colza 73496 est la protéine GAT4621. La cassette d'expression du gène *gat4621* a été introduite dans *E. coli* pour y produire la protéine et l'utiliser pour sa caractérisation et pour les tests de toxicité. Cette protéine est équivalente à celle provenant du colza 73496 sur la base de résultats d'électrophorèse, de western blot, d'analyse de glycosylation, de séquence N-terminale et de spectroscopie de masse.

#### **Caractérisation moléculaire et biochimique de la protéine GAT4621.**

La protéine GAT4621 exprimée dans le colza 73496 diffère des protéines GAT d'origine par la substitution de 29 acides aminés et l'ajout d'une alanine en position 2.

La spécificité de substrat de la protéine a été étudiée. GAT4621 acétyle les résidus acide aspartique, acide glutamique, sérine, thréonine et glycine, ce dernier avec une très faible efficacité (< 1%). L'enzyme n'a montré aucune activité envers les autres acides aminés, 11 antibiotiques et 20 produits phytosanitaires.

**L'évaluation de la sécurité de l'enzyme GAT repose aussi sur :**

- l'absence d'homologie de séquence significative entre GAT4621 et les séquences de protéines répertoriées comme toxines ;
- sa sensibilité aux enzymes protéolytiques (pepsine et pancréatine) dans des tests *in vitro* ;
- sa concentration inférieure à la limite de quantification dans les produits issus de la plante destinés à l'alimentation (tourteaux toastés, huile).

S'agissant d'une nouvelle protéine, une étude de toxicité de 28 jours sur souris CD-1 a été réalisée. Les animaux ont reçu les doses théoriques de 0 à 1000 mg/kg p.c./jour de protéine GAT4621 incorporée dans la nourriture. Les résultats de cette expérience ne mettent pas en évidence de toxicité après 28 jours d'observation.

La NOEL déduite de cette étude est de **833 mg/kg p.c./jour et de 1034 mg/kg p.c./jour** chez les mâles et les femelles respectivement.

**Une étude de toxicité aiguë** provenant d'une autre demande concernant un maïs (98140) exprimant la même protéine est également fournie. Cette étude a été réalisée sur 5 souris de chaque sexe à la dose de 2000 mg/kg, correspondant à 1558 mg/kg réellement ingéré, et n'a pas mis en évidence de toxicité.

A.4.3 Evaluation des nouveaux constituants autres que les protéines  
Sans objet

A.4.4 Evaluation des constituants des denrées alimentaires et aliment pour animaux dont les niveaux sont altérés

Les concentrations de NAA, NAG et NAT sont fortement augmentées dans les graines de colza 73496 par rapport au colza témoin.

Des données sont apportées pour montrer que ces acides aminés acétylés sont aussi retrouvés dans de nombreux constituants de l'alimentation humaine (viandes, œufs, légumes, fruits...). Toutefois, les concentrations présentées pour ces différents produits sont inférieures à celles retrouvées dans le colza 73496.

Pour évaluer la sécurité du colza 73496 contenant des concentrations d'acides aminés acétylés élevées, le pétitionnaire a réalisé une recherche bibliographique sur les fonctions physiologiques du NAA et NAG, une évaluation de leur consommation et des études toxicologiques.

Ainsi, la sécurité de chacun des 3 acides aminés acétylés a été évaluée par 1) une étude de toxicité aiguë, 2) une étude de toxicité 28 jours, 3) un test d'Ames et 4) un test du micronoyau sur mammifères. Considérant l'élévation importante des concentrations de NAA, d'autres tests ont été ajoutés pour cet acide aminé acétylé : 5) une étude de toxicité 90 jours sur rats et 6) une étude de reproduction sur 2 générations de rats (Cf tableau 3).

**Tableau 3 :** Etudes toxicologiques réalisées sur le NAA (N-acétyl aspartate).

Type d'étude	Dose (nombre d'animaux /groupe)	Résultats
<b>Toxicité aiguë</b>	5000 mg/kg p.c (5 rats SD/groupe/sexe)	mortalité chez les femelles et signes de toxicité chez les mâles.
<b>Toxicité aiguë</b>	2000 mg/kg p.c. (10 rats SD/groupe/sexe)	pas de signe de toxicité sur les paramètres suivants : poids des animaux, observation clinique, examen macroscopique des organes.

<b>Toxicité sub-chronique de 28 jours</b>	0, 10/100, 100/500 ou 1000 mg/kg p.c./jour de NAA Pour les groupes 10/100 et 100/500, les rats SD ont été exposés à 10 et 100 mg/kg p.c. pendant les 14 premiers jours, puis à 100 et 500 mg/kg p.c. pour le reste de l'étude	pas de signe de toxicité ou anomalies sur : mortalité, signes cliniques, poids, consommation, activité motrice ou comportementale, examen ophtalmologique, paramètres urinaires, macroscopie à l'autopsie, poids des organes, paramètres hématologiques et biochimiques, histologie. <b>NOAEL mâles = 852,3 mg/kg/jour</b> <b>NOAEL femelles = 890,1 mg/kg/jour</b>
<b>Test d'Ames</b>	333, 667, 1000, 3333 et 5000 µg/plaque pour chacune des souches (4 souches de <i>Salmonella typhimurium</i> et une souche d' <i>E. coli</i> )	Aucune réponse mutagène n'a été relevée.
<b>Test du micronoyau</b>	0, 333, 1000, ou 2000 mg/kg p.c. de NAA par gavage (10 ou 14 souris/groupe /sexe)	Aucun signe clinique de toxicité ou de mortalité et pas d'augmentation de l'incidence des PCE (érythrocytes polychromatiques) ou des MNPCE (érythrocytes polychromatiques micronucléés)
<b>Etude de toxicité sub-chronique de 90 jours</b>	100, 250, 500 mg/kg p.c./jour Contrôle = acide aspartique à 500 mg/kg p.c./jour (10 rats/groupe/sexe) suit la ligne directrice OCDE 408	Pas de signe de toxicité sur : mortalité, observation clinique et ophtalmologique, consommation, analyses urinaires, paramètres biochimiques, poids des animaux et des organes. Cependant, une augmentation de l'incidence et du degré d'hypertrophie des cellules acineuses, des glandes salivaires submandibulaires, parotides et sublinguales (à un moindre degré pour les deux dernières) des mâles et femelles du groupe 500 mg/kg p.c./jour est observée. Aucun signe de toxicité au niveau cellulaire. <b>NOAEL* mâles = 451,6 mg/kg/jour</b> <b>NOAEL* femelles = 490,8 mg/kg/jour</b> <b>NOEL** mâles = 229,5 mg/kg/jour</b> <b>NOEL** femelles = 253,2 mg/kg/jour</b>
<b>Etude de reproduction sur deux générations***</b>	0, 100, 250, 500 mg/kg p.c. /jour NAA Contrôle = 500 mg/ kg p.c. /jour acide aspartique (25 rats/groupe/sexe) suit la ligne directrice OCDE 416	Aucune différence dans les paramètres étudiés, à part l'hypertrophie des cellules acineuses des glandes salivaires chez les mâles et les femelles de la génération F1 et les mâles de la génération F2 du groupe 500 mg/kg p.c./jour

\* NOAEL No-observed-adverse-effect-level en considérant les effets sur les glandes salivaires comme une réponse adaptative

\*\* NOEL No-observed-effect-level

\*\*\* Karaman *et al.* Food chem toxicol 2011 49 :3192-3205.

### **NAG et NAT N-acétyl glutamate et N-acétyl thréonine**

Pour documenter la sécurité du NAG et du NAT, plusieurs études dont les résultats sont publiés<sup>3</sup> sont présentées.

Les études de toxicité aiguë par gavage n'ont montré aucun effet indésirable chez des rats Sprague-Dawley à la dose limite préconisée par l'OCDE de 2000 mg/kg p.c.. En outre, aucun effet indésirable n'a été observé chez les rats après une exposition répétée de 28 jours à la dose de 1000 mg/kg p.c.. Les NOAEL déduites de cette étude ont été fixées à **953,0 et 1046,7 mg/kg p.c. de NAG** et **848,5 et 913,6 mg/kg p.c. de NAT** pour les mâles et les femelles, respectivement. Enfin, le NAG et le NAT n'ont pas été détectés mutagènes par le test d'Ames ou le test du micronoyau sur cellules de mammifères.

#### A.4.5 Evaluation de l'aliment dérivé de plantes GM (denrées alimentaires et/ou aliments pour animaux) dans sa globalité

##### A.4.5.1 Protocole expérimental et réalisation d'une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours chez les rongeurs.

L'étude comprend 7 groupes de 12 animaux de chaque sexe. Les rats sont nourris avec un régime contenant environ 20% de tourteaux provenant de graines de colza dépelliculées et de 2% d'huile raffinée, blanchie, désodorisée extraite de graines de colza. Les différents traitements dépendent du colza dont proviennent les tourteaux et l'huile, soit le colza 73496 traité par le glyphosate, le colza 73496 traité par un autre herbicide, le colza comparateur et les quatre variétés commerciales.

Les concentrations en NAA, NAG, NAT ont été mesurées dans les régimes alimentaires issus du colza 73496, du colza comparateur ou des variétés de colzas commerciales.

##### A.4.5.2 Interprétation des études sur animaux

Aucune différence significative n'a été observée entre le groupe nourri avec le colza 73496 et celui nourri avec le colza comparateur en ce qui concerne la mortalité, le poids et le gain de poids, la consommation et l'efficacité alimentaires, les examens cliniques, ophtalmologiques et neurocomportementaux, la pathologie clinique (hématologie, coagulation, biochimie et analyse d'urine), le poids des organes, les observations macroscopiques et microscopiques.

#### A.4.6 Conclusion

L'introduction de l'évènement 73496 génère des modifications de la concentration de trois acides aminés acétylés (NAA, NAG, NAT) dans la graine de colza, jusqu'à une augmentation de 500 fois pour le NAA. De nombreuses études toxicologiques sont présentées pour évaluer la sécurité de ce colza sur la protéine GAT4621, les acides aminés acétylés et l'aliment entier.

Des NOAELs pour la protéine GAT4621 et pour les acides aminés acétylés ont été déduites de ces études. Pour le NAA, elle résulte de l'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours considérant les effets sur les glandes salivaires comme une réponse adaptative. Pour le NAG et le NAT, la NOAEL a été déduite de l'étude 28 jours.

Concernant l'étude 90 jours avec l'aliment entier, le régime inclut à la fois le tourteau et l'huile, issus de colza 73496 traité par le glyphosate, ce qui est considéré comme pertinent. Une seule dose a été mise en œuvre correspondant toutefois au maximum d'incorporation recommandée dans l'alimentation animale.

Dans les conditions de cette étude, aucune différence significative n'a été observée entre les rats nourris avec un régime contenant le colza 73496 traité par le glyphosate ou un autre herbicide et les rats nourris avec un régime contenant le colza comparateur ou des variétés de colza commerciales.

<sup>3</sup> Harper *et al.* *Food chem toxicol* 2009 47 :2723-2729

Il est toutefois à noter que les données brutes de l'étude n'ont été transmises que sous format pdf. La mise en œuvre d'un faible nombre d'animaux (12 animaux/groupe et par sexe) augmente le risque d'avoir une puissance insuffisante pour les tests statistiques.

#### A.5 Evaluation de l'allergénicité

##### A.5.1 Evaluation de l'allergénicité de la protéine nouvellement produite

Le potentiel allergénique de la protéine GAT4621 exprimée dans le colza 73496, a été évalué à l'aide des critères d'évaluation de l'allergénicité recommandés par l'EFSA, à savoir:

- l'absence d'allergénicité connue de la source de la protéine GAT4621, *Bacillus licheniformis*, bactérie du sol à l'origine de certaines préparations enzymatiques alimentaires ;
- l'absence d'homologie de séquence entre la protéine GAT4621 et les allergènes de la banque de séquences FARRP12 (version 12, février 2012), utilisant l'algorithme FASTA35 (seuil de 35% sur 80 acides aminés consécutifs) et une fenêtre de 8 résidus.
- la faible résistance à la protéolyse digestive de la protéine GAT4621 en conditions de digestion gastrique simulée *in vitro* (SGF) en présence de pepsine ou de digestion intestinale simulée *in vitro* (SIF) en présence de pancréatine.
- l'absence de la protéine dans l'huile raffinée

##### A.5.2 Evaluation de l'allergénicité de la plante GM

Considérant que le produit consommé par l'homme est l'huile raffinée et désodorisée pour laquelle la protéine GAT4621 n'est pas présente (< à la LOQ), l'évaluation du risque d'allergie est sans objet.

##### A.5.3 Propriétés adjuvantes

Les analyses bioinformatiques ne montrent aucune homologie de séquence entre la protéine GAT4621 et des protéines adjuvantes (toxines). L'absence de protéine GAT4621 dans l'huile de colza commercialisée permet d'écarter l'hypothèse d'une activité adjuvante de cette huile.

##### A.5.4 Conclusion

Ces résultats suggèrent l'absence de potentiel allergénique et de propriété adjuvante de la protéine GAT4621 exprimée dans les colzas 73496. 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.

Aucun élément ne suggère une allergénicité du colza transgénique 73496 et de ces produits dérivés, supérieure à celle du colza non transgénique.

#### A.6 Evaluation nutritionnelle

##### A.6.1 Evaluation nutritionnelle des denrées alimentaires dérivées des PGM

Le pétitionnaire rappelle ici les résultats de l'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours réalisée chez le rat par administration orale de tourteaux et d'huile de colza.

Les conclusions de l'analyse comparée de composition ont montré que les teneurs des acides aminés acétylés sont fortement augmentées dans les graines et les tourteaux. En revanche, ils ne sont pas détectés dans l'huile, principal produit destiné à l'Homme.

##### A.6.2 Evaluation nutritionnelle des aliments pour animaux dérivés des PGM

Une étude nutritionnelle a été réalisée chez des poulets de façon à comparer les caractéristiques nutritionnelles du colza portant l'événement 73496 avec celles du colza comparateur non transgénique et de 4 variétés commerciales de colza. Le colza 73496 testé a été traité avec le glyphosate ou avec un herbicide conventionnel. Le produit

administré aux poulets dans leur alimentation est le tourteau provenant de graines non dépelliculées.

Chacun des 7 types de tourteaux est testé sur 120 poulets Ross 708, répartis dans 12 parquets de 5 mâles et 5 femelles. Pendant 42 jours les poulets reçoivent successivement un régime de démarrage de 0 à 21 jours contenant 10% de tourteaux de colza, un régime de croissance de 22 à 35 jours contenant 20% de tourteaux de colza, puis un régime de finition de 36 à 42 jours sans tourteaux de colza. La protéine GAT4621 a été quantifiée par ELISA dans les tourteaux et les régimes à base de colza 73496. Les analyses de composition chimique (énergie brute, teneurs en eau, en protéines, en lipides, fibres, cendres, calcium, phosphore et acides aminés) des tourteaux de chaque colza utilisé ont été réalisées. Les tourteaux issus de graines génétiquement modifiées sont plus riches (d'environ 10%) en protéines que les autres tourteaux. Il en est de même des teneurs en acides aminés. Les toxines fongiques sont soit non détectées, soit quantifiées à une teneur inférieure aux normes (mycotoxine et fumonisine M1). Les facteurs antinutritionnels présents : glucosinolates, tannins, sinapine ont des teneurs incluses dans les gammes de référence.

Vingt mâles et vingt femelles par traitement expérimental sont sélectionnés par tirage au sort pour des analyses de sérum et post mortem. Les prélèvements pour les mesures de rendement sont effectués sur 4 mâles et 4 femelles par parquet soit 96 par traitement alimentaire à l'âge de 42 jours. Les analyses ont porté sur les cuisses et les pilons, les filets, le gras abdominal, les reins et le foie.

L'analyse statistique est décrite et intègre un effet bloc. Le niveau de signification retenu est 5%. Il est regrettable que l'analyse des performances zootechniques n'intègre pas l'effet sexe, contribuant ainsi à accroître la variabilité. L'effet sexe est pris en compte pour l'analyse des rendements.

Les performances de croissance, la mortalité, l'indice de consommation, le poids des organes ne diffèrent pas selon le colza utilisé. Les rendements en carcasse et les pourcentages de cuisse, pilon, filets, aile, gras abdominal ne dépendent pas du traitement alimentaire.

#### A.6.3 Conclusion

Sur la base des données fournies, aucune différence de la valeur nutritionnelle des tourteaux issus de colza transgénique 73496 traité ou non par le glyphosate et des tourteaux issus de colzas comparateurs et de variétés de référence n'est observée.

### **B. Evaluation de l'exposition – consommation/ extension d'emploi**

Le pétitionnaire a réalisé cette évaluation sur l'huile et les tourteaux, les deux produits dérivés du colza destinés à l'alimentation humaine ou animale. Une approche maximaliste a été utilisée considérant que la totalité de l'huile et des tourteaux consommés sont issus du colza 73496.

Concernant la protéine GAT4621, une très faible quantité est mesurée dans les graines (5,6 ng/mg de poids sec). Elle devient indétectable dans les tourteaux toastés et dans l'huile raffinée. On peut donc considérer que le niveau d'exposition à cette protéine est négligeable.

Concernant les acides aminés acétylés, les données fournies indiquent qu'aucun d'entre eux n'a été retrouvé dans l'huile raffinée. L'étude d'exposition ne portera que sur les tourteaux de colza.

Les concentrations de NAA, NAG et NAT sont respectivement

- de 1710, 29,3 et 0,896 µg/g de poids sec dans les graines de colza 73496 traité au glyphosate,
- de 3070, 53,7, et 2,90 µg/g dans les tourteaux toastés,
- de 3489, 61 et 3,30 µg/g dans les tourteaux toastés après ajustement en raison du pourcentage d'humidité.

L'exposition journalière à ces 3 acides aminés acétylés a été estimée pour les espèces cibles sachant que le taux d'inclusion de colza dans le régime alimentaire des animaux de rente est de 10 à 20%.

### **C. Caractérisation du risque**

La toxicité potentielle du colza 73496 a été évaluée par 17 tests portant sur :

- 1) la protéine nouvellement exprimée GAT4621 ;
- 2) les acides aminés N-acétyl-aspartate (NAA), N-acétyl-glutamate (NAG), N-acétyl-thréonine (NAT), en raison de l'augmentation de leur concentration dans les graines colza 73496 par rapport aux graines de colza conventionnel ;
- 3) l'aliment entier préparé à partir du colza 73496 ;

La protéine GAT4621 est retrouvée en très faible quantité dans les graines de colza et n'est pas détectable dans les tourteaux ou l'huile raffinée. On peut donc considérer que le risque d'exposition à cette protéine GAT4621 dans le colza 73496 est extrêmement faible.

Le risque considéré est lié à la présence des acides aminés acétylés dans les graines de colza 73496. Ces acides aminés acétylés n'étant pas détectable dans l'huile, ils ne constituent pas un risque pour la consommation humaine.

Concernant l'alimentation animale, les marges d'exposition ont été calculées par le pétitionnaire en fonction des NOAEL des études rats 28 jours (dose théorique de 1000 mg/kg p.c./jour). Ainsi, les marges d'exposition sont élevées pour le NAG et le NAT, mais sont plus faibles pour le NAA (de 20 à 60 selon l'espèce animale cible considérée).

Le GT a considéré la dose de 250 mg/kg p.c./jour sans aucun effet (NOEL) de l'étude rat 90 jours réalisé avec le NAA. Les marges d'exposition sont alors de 5 à 15 pour le NAA selon l'espèce animale cible, elles sont de l'ordre de 10 à 30 si l'on considère la NOAEL de 500 mg/kg p.c./jour.

## **4. CONCLUSION DU GT**

La caractérisation moléculaire de l'événement 73496 ne met en évidence aucun élément évocateur d'un risque pour le consommateur de colza 73496.

Cependant, une analyse plus précise du site d'insertion avec une comparaison des séquences génomiques de colza avant et après l'insertion est nécessaire pour une caractérisation complète.

La composition chimique de la graine et du tourteau issu du colza 73496 traité ou non avec le glyphosate est différente de celles des graines et du tourteau issu du colza comparateur et des variétés commerciales, en raison d'une augmentation significative de la teneur en acides aminés acétylés (en particulier NAA et NAG) dans les colzas 73496 par rapport aux colzas comparateurs et de variétés commerciales. Cette observation est en lien avec la fonction d'acétylation de la protéine GAT4621, exprimée par le transgène.

Les teneurs en glyphosate, N-acétyl glyphosate et en leurs métabolites (AMPA et N-acétyl AMPA) auraient dû être mesurées. Par ailleurs, le GT rappelle que l'utilisation du glyphosate sur ces colzas devra être évaluée par les instances européennes compétentes avant l'autorisation de mise sur le marché des colzas 73496.

De nombreuses études toxicologiques visant à évaluer la sécurité de ce colza sont présentées : sur la protéine GAT4621 ; sur les composés dont la concentration a été modifiée et sur l'aliment entier (étude de toxicité sub-chronique de 90 jours).

Concernant l'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours par incorporation dans l'alimentation de tourteau et d'huile de colza 73496 traité par le glyphosate ou par un autre

herbicide, les résultats de cette étude n'ont pas mis en évidence d'effet néfaste ou toxique pour les animaux.

Aucun élément ne suggère une allergénicité du colza transgénique et de l'huile qui en est extraite, supérieure à celle du colza non transgénique. De même, les données suggèrent qu'il n'existe pas de différences de valeur nutritionnelle entre les tourteaux de colza issus de graines transgéniques traitées ou non au glyphosate et les colzas témoins.

Le produit dérivé du colza consommé par l'Homme étant essentiellement l'huile, le risque d'exposition aux composés dont la concentration a été modifiée lié à la consommation de cette huile est négligeable.

Le produit dérivé du colza utilisé en alimentation animale est le tourteau. La marge d'exposition déterminée par le GT varie de 5 à 15 selon l'espèce cible considérée. Compte tenu de ces faibles marges, le GT recommande qu'un suivi post commercialisation soit envisagé sur une ou plusieurs espèces cibles.

Le GT considère que ce dossier est bien documenté et suit une démarche tout à fait pertinente en ce qui concerne l'évaluation de la sécurité du produit. Toutefois, il ne peut se prononcer sur la sécurité du colza 73496 en l'absence :

- des éléments complémentaires nécessaires à la caractérisation moléculaire complète du site d'insertion
- des teneurs en glyphosate N-acétyl glyphosate et ses métabolites.

## **5. CONCLUSION DE L'AGENCE**

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions du Groupe de travail « 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 73496 développé afin d'être tolérant au glyphosate.

**Le directeur général**

Marc Mortureux

## **MOTS-CLES**

OGM, colza 73496, tolérance au glyphosate, GAT4621.