

Maisons-Alfort, le 2 juillet 2007

AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché
d'un colza génétiquement modifié T45 tolérant à un herbicide
pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale
de grains et produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003**

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 16 avril 2007 par la Direction générale de concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis sur un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un colza génétiquement modifié T45 tolérant à un herbicide, pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 (dossier n°EFSA/UK/2005/25).

Conformément au Règlement (CE) n° 1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA) 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 ce cadre que la DGCCRF a sollicité l'avis de l'Afssa.

Après consultation du Comité d'expert spécialisé "Biotechnologie", réuni le 21 juin 2007, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

(A) Information générale

Ce dossier concerne une demande d'autorisation de mise sur le marché pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de graines (et produits dérivés) issues d'un colza génétiquement modifié T45. Ce colza a été rendu tolérant à un herbicide, le glufosinate d'ammonium, par l'introduction du gène *pat* codant une enzyme, la phosphinothricine N-acétyltransférase (PAT), qui en acétylant le glufonisate le rend non toxique pour la plante.

La demande n'inclut pas la culture de ce colza T45 en Europe.

Le pétitionnaire indique que l'événement T45 a d'abord été commercialisé au Canada et aux Etats-Unis en 1998 mais qu'à partir de 2003, en raison de la faible commercialisation des variétés de colza T45, il a procédé au retrait des licences de diffusion de ces variétés. En 2006, aucune graine de T45 n'a été commercialisée et les stocks détruits. Le pétitionnaire s'est engagé à ne plus commercialiser ces plantes dans le futur et a demandé le retrait de l'autorisation de commercialisation des variétés de colza T45 au Canada. Cependant, la présence de traces de T45 ne peut être exclue dans les lots qui pourraient être importés en Europe.

(C.) Informations relatives à la modification génétique

(1) La lignée transgénique a été obtenue à l'aide d'une souche désarmée d'*Agrobacterium tumefaciens* portant le vecteur de transformation. Des protoplastes de colza de la variété de colza AC Excel ont été mis en contact avec une souche désarmée d'*Agrobacterium* portant un vecteur de transformation fonctionnant en système binaire (l'ADN-T est sur le

vecteur de transformation tandis que les fonctions de virulence permettant son transfert sont codées par un plasmide Ti lui même dépourvu d'ADN-T).

- (3) Considérant que l'ADN-T de 1438 pb porté par le vecteur de transformation pHOE4/Ac(II) comporte les éléments suivants :
- la bordure droite du T-DNA d'*Agrobacterium tumefaciens*,
 - le gène *pat* dérivé du gène *pat* originel de *Streptomyces viridochromogenes* sous contrôle des promoteur et terminateur 35S du CaMV (virus de la mosaïque du chou-fleur)
 - la bordure gauche du T-DNA d'*Agrobacterium tumefaciens* ;

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

- (1) Considérant que cette construction a pour but d'augmenter la tolérance à un herbicide, le glufosinate d'ammonium, et que le gène *pat* d'origine procaryotique a été mis sous contrôle d'un promoteur et d'un terminateur fonctionnant constitutivement dans la plante ;

(2) Informations relatives aux séquences réellement insérées

Considérant que des hybridations moléculaires de type Southern (réalisées avec différentes sondes radiomarquées correspondant au produit d'amplification par PCR de chaque portion du vecteur plasmidique) et l'analyse des séquences du transgène et de ses régions bordures montrent que :

- la séquence du transgène inséré dans le colza correspond à celle du T-DNA dans le vecteur utilisé pour la transformation ;
- le transgène est présent en une copie unique dans le génome du colza ;
- aucune autre séquence originaire du vecteur binaire n'est présente ;
- le transgène est complet et intact dans le génome du colza ;

Considérant que 911 pb flanquant la bordure droite et 994 pb flanquant la bordure gauche du transgène ont été séquencées après amplification par la méthode TAIL-PCR, que ces séquences sont bien d'origine végétale (colza) et sont détectables dans la lignée non génétiquement modifiée ;

Considérant que le séquençage d'un fragment de 1900 pb de la plante parentale correspondant au point d'insertion du transgène, a montré la délétion d'un fragment de 48 pb dans le génome de la plante transgénique et qu'à la jonction 5', une insertion de 9 pb a été détectée provenant d'une duplication de la région 3' ;

Considérant que l'analyse bio-informatique des séquences de bordure et du transgène a détecté 36 phases ouvertes de lecture (ORF) putatives et cryptiques, que 4 ORF auraient été créées suite à l'insertion du transgène et qu'aucune de ces ORF ne serait active (tant au niveau transcriptionnel que traductionnel) ;

Considérant que la localisation du transgène sur l'un des chromosomes du colza n'est pas précisée dans le dossier ;

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

Considérant que la teneur en protéine PAT a été mesurée par la méthode ELISA dans les feuilles et dans la graine prélevées sur des plantes cultivées au Canada sur 4 sites en 1998, traitées et non traitées au glufosinate, donnant les résultats suivants (tableau 1) :

Tableau 1 : Teneur moyenne en protéine PAT dans le colza T45 (ng/g de poids frais)

	Feuille	Graine
Plantes traitées au glufosinate	733	662
Plantes non traitées	806	588

Considérant que ces résultats montrent que les teneurs en protéine PAT sont faibles, que la protéine est exprimée plus dans la feuille que dans la graine et que le traitement au glufosinate n'entraîne pas de modification de ces teneurs ;

Considérant que la teneur en ARN transcrit du gène *pat* mesurée dans la plante montre que cette teneur est la plus importante dans la feuille, décroît dans la tige et n'est plus détectable dans la graine à maturation ;

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

Considérant que l'analyse par ELISA et PCR de plantes jusqu'à la 3^{ème} génération montre que les transgènes sont co-transmis à la descendance comme un caractère mendélien dominant, et que la structure de l'ADN-T, telle qu'analysée par Southern dans des plantes de 3^{ème} génération, s'avère inchangée ;

(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**

Considérant qu'une analyse de composition chimique a été réalisée sur des graines de colza T45 cultivé au Canada :

- sur 6 sites en 2000 et comparée à celle d'échantillons d'un colza témoin (AC Elect) ;
- sur 6 sites en 2004 et comparée à celle d'échantillons d'un maïs témoin (Variety A) ;

Considérant que l'analyse de composition des échantillons de graine a porté :

- en 2000 sur les paramètres suivants : protéines brutes, matière grasse, cendres, humidité, ADF, NDF, fibres totales, acides aminés, tocophérols ;
- en 2004 sur les paramètres suivants : protéines brutes, matière grasse, cendres, humidité, ADF, NDF, fibres totales, 18 acides aminés, 14 acides gras, tocophérols, 9 minéraux et 4 facteurs anti-nutritionnels (acide phytique et 3 glucosinolates : alkényl glucosine, MSGL glucosine et indole glucosine) ;

Considérant que :

- pour les paramètres de **composition fourragère**, peu de variations sont observées sur la graine, à l'exception des différences significatives sur la teneur en NDF (inférieures dans le colza T45 à celles observées dans le colza témoin dans 4 sites sur 6) ;
- les **teneurs en acides aminés**, bien qu'exprimées sur des bases différentes sur le tourteau en 2000 et sur la graine en 2004 (tableau 2), sont comparables à l'exception de 2 différences sporadiques observées en 2000 pour la cystine, la lysine et la thréonine (différences significatives entre le témoin et le colza T45 traité par l'herbicide sur 4 sites sur 6), résultats non confirmés en 2004 ;

Tableau 2 : Teneurs en protéines totales de la graine et du tourteau déshuilé (exprimées en % de poids frais)

Paramètre	Année	Témoin	T45 traité par herbicide conventionnel	T45 traité au glufosinate
Protéines	2000 (graine)	25,4	24,5	24,6
	2004 (graine)	27,3	26,7	26,7
Lysine	2000 (tourteau)	2,31	2,31	2,18
	2004 (graine)	1,55	1,52	1,54
Thréonine	2000 (tourteau)	1,84	1,84	1,79
	2004 (graine)	1,13	1,10	1,11
Cystine	2000 (tourteau)	0,93	0,92	1,00
	2004 (graine)	0,63	0,66	0,67

- les **teneurs en acides gras**, (déterminées apparemment sur la matière grasse de la graine) sont variables :
 - * les teneurs en acides stéarique et en C20:0, significativement plus élevées dans le colza témoin, sont très faibles, respectivement de 1,9 et 0,7 % des acides gras ;
 - * les différences de teneurs en C18:2, C18:3 et C20:2 (acides gras polyinsaturés) sont significatives lorsque les acides gras sont pris individuellement mais leur somme ne diffère plus significativement ;
- la **teneur en tocophérols**, surtout divergente pour l' α -tocophérol en 2004 ne fait pas apparaître de différence significative lorsqu'elle est exprimée en tocophérols totaux ;
- la **teneur en minéraux** de la graine disponible pour la récolte 2004 montre également des différences significatives non systématiques à l'exemple d'une teneur exceptionnellement élevée en fer pour un échantillon ; les teneurs sont très faibles par rapport au besoin des animaux ;

Considérant que, pour l'ensemble des paramètres évalués ci-dessus, les différences observées sont sans signification biologique, s'inscrivent dans les valeurs de la littérature, et peuvent être considérées comme non liées ni à la modification génétique ni au traitement par le glufosinate ;

Considérant que, pour les **facteurs anti-nutritionnels**, si la teneur en acide érucique est très faible, non significativement différente entre les traitements et très nettement inférieure aux recommandations de OCDE 2001, les teneurs en acide phytique, en indole glucosinolates et glucosinolates totaux sont toujours significativement supérieures dans le colza T45 (tableau 3) :

Tableau 3 : Teneur en facteurs anti-nutritionnels et toxiques de la graine de colza

	Témoin (A)	T45 non traité (B)	T45 traité (C)	Comparaison statistique
Acide érucique C22 :1 (% acides gras)	0,05	0,07	0,05	NS
Acide phytique (% de poids frais)	2,21	2,45	2,38	A<B ; A<C
Indole glucosinolates (μ moles/g)	4,2	5,6	5,7	A<B ; A<C
Total glucosinolates (μ moles/g)	13,41	15,25	15,83	A<B ; A<C

Considérant que les différences étant significatives à $p < 0,001$ dans 5 et 6 sites pour les indole glucosinolates, il aurait été indispensable de déterminer ces teneurs sur le tourteau déshuilé où se retrouvent plus spécifiquement les glucosinolates dont la teneur maximum pour les animaux domestiques a été fixée à 30 μ moles par gramme (Fenwick et al, 1986¹) ;

Considérant que compte tenu des différences observées sur les glucosinolates, il n'est pas possible de conclure définitivement sur une équivalence en substance d'un colza portant l'évènement T45 avec son témoin ;

(7.4) **Analyse comparative des caractères agronomiques**

Considérant que les caractéristiques agronomiques de la plante, notamment morphologiques, ne sont pas modifiées par la transformation (données de 1995-1997) mais que, toutefois, il aurait été apprécié de disposer de données comparatives sur la plante traitée et plus généralement sur les échantillons issus des essais 2000 et 2004 qui sont, sans doute, plus représentatifs de la plante de 2007 ;

¹ Fenwick, G.R. et al., 1986. Effect of processing on the antinutrient content of rapeseed. J. Sci. Food Agriculture. 37:735-741.

(7.7) Spécificité des produits et effet des traitements technologiques

Considérant que la graine entière et le tourteau, déshuilé par des solvants et toasté à plus de 100 °C en vue d'une élimination partielle des glucosinolates, ainsi que l'huile brute sont destinés exclusivement à l'alimentation animale et que l'huile désodorisée et blanchie est destinée pure ou en mélange à l'alimentation humaine ; aucune donnée n'est fournie cependant pour justifier que les glucosinolates seront éliminés par le procédé de traitement ;

Considérant que, compte tenu des teneurs en protéine PAT très faibles dans les produits dérivés du colza T45, l'exposition de l'homme et de l'animal sera très limitée ;

(7.8) Toxicologie

Considérant que la protéine PAT issue d'*E.coli* et celle extraite des feuilles de colza T45 présentent :

- le même poids moléculaire de 22,26 kDa ;
- la même activité enzymatique par rapport au même substrat ;
- l'absence de glycosylation ;
- la même structure N-terminale (Met-Ser (Asp)-Pro-Glu) ;

Considérant que la comparaison de la séquence de la protéine PAT avec celles de peptides connus pour être toxiques répertoriés dans des bases de données ne met pas en évidence de similitude ;

Considérant que la protéine PAT issue de *E. coli* est stable (non fragmentée) après chauffage à 90 °C pendant 60 minutes, qu'elle perd son activité enzymatique à 56 °C et qu'elle est dégradée en quelques secondes en milieu gastrique simulé (pH 2) et digérée en milieu intestinal simulé à pH 7,5 (pH optimum d'action) ;

Considérant qu'une étude de toxicité aiguë chez la souris femelle, recevant par voie intraveineuse une dose unique de protéine PAT de 10 mg/kg de poids corporel (p.c.), et qu'aucune toxicité ni mortalité n'a été observée dans les 15 jours suivant l'administration, alors que la protéine de référence, la mélitine, entraîne 100 % de mortalité ;

Considérant qu'une étude de toxicité répétée pendant 14 jours a été réalisée par voie orale chez le rat (5 mâles et 5 femelles par traitement) avec la protéine PAT issue d'*E. coli* administrée dans l'alimentation aux doses de 700 et 7600-7800 mg/kg p.c./j et que les performances pondérales, le poids des organes (6), les paramètres sanguins (39), urinaires (13), macroscopiques (45) et histopathologiques (26) ont été mesurés ;

Considérant que les quelques différences observées (taux de glucose, de cholestérol et triglycérides sanguins), qui sont sans effet-dose, étant sans signification biologique, il est possible de conclure à l'absence de toxicité de la protéine PAT administrée par voie orale chez les rongeurs ;

Considérant cependant que :

- des différences sont observées sur les teneurs en indole glucosinolates, connus comme goitrogènes ;
- des effets délétères ont déjà été observés chez le rat nourris avec un autre colza tolérant à un herbicide dont le taux en glucosinolates avait été augmenté (Myers et al, 2002²) ;

une étude de toxicité subchronique 90 jours chez le rat réalisée avec le colza T45 aurait permis de s'assurer de l'absence d'éventuels effets non intentionnels ;

(7.9) Allergénicité

Considérant qu'au regard des éléments suivants, l'existence d'un potentiel allergénique de la protéine PAT ne peut pas être suspectée :

² Myers *et al* (2002) GM crops: assessing safety, Office of Food Technology Health Canada Ottawa

- absence d'homologie de structure avec des protéines connues comme allergènes répertoriées dans des bases de données ;
- absence de glycosylation chez le colza ;
- instabilité de la protéine PAT en milieu liquide aussi bien à pH neutre qu'à pH acide ;

Considérant qu'il convient cependant de noter que ces données, notamment les résultats de dégradation et digestion *in vitro* des protéines et la comparaison de séquences, ne suffisent pas, pour autant, pour 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**

Considérant qu'une étude d'alimentarité a été réalisée chez le poulet (420 animaux) nourri pendant 42 jours avec trois régimes (0-7 jours, 7-21 jours et 22-42 jours), contenant 10 % de graines de colza T45 traité au glufosinate ou non traité, cultivé au Canada en 2004 en comparaison avec des poulets nourris dans les mêmes conditions avec du colza témoin ;

Considérant qu'une analyse de composition complète de la graine a été réalisée [analyse fourragère (8 paramètres), acides aminés (18), minéraux (15 dont 4 métaux lourds), flore totale, pesticides (19), les 4 tocophérols, teneurs éventuelles en glufosinate, teneurs en facteurs anti-nutritionnels] et qu'il convient de noter que les teneurs en glucosinolates (alkenyl, indolyl et totaux) et en acide phytique sont plus faibles que les teneurs mesurées dans les échantillons ayant servi à réaliser l'analyse de composition (§ 7.4) ;

Considérant que les observations qui ont porté sur des paramètres zootechniques et de rendement sur carcasse montrent que

- un taux de mortalité relativement élevé (7,9 %) non relié au traitement (13/140, 9/140, 11/140 respectivement pour les trois traitements), attribué par les auteurs à la souche de poussins ;
- aucune différence significative sur les paramètres de croissance consommation et efficacité alimentaire ;
- aucune différence significative entre les 19 paramètres de mesures effectuées sur les carcasses, y compris le poids du tissu gras abdominal et le poids de la peau ;

Considérant l'ensemble des résultats présentés dans cette étude d'alimentarité, il est possible de conclure à une équivalence alimentaire des graines de colza T45 avec celles du colza témoin pour le poulet ;

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments, considérant que les données fournies dans ce dossier, notamment l'absence d'une étude de toxicité subchronique 90 jours chez le rat par voie orale qui aurait permis d'éliminer l'hypothèse d'un risque d'effet délétère consécutif à une augmentation (non intentionnelle) significative par rapport au témoin de la teneur en facteurs anti-nutritionnels ou toxiques dans le colza T45 lié à la modification génétique, estime que la consommation humaine ou animale régulière de produits dérivés (huile et tourteau) de colzas portant l'événement de transformation T45 ne présente pas le même niveau de sécurité sanitaire que la consommation de produits dérivés d'un colza conventionnel.

Cas de lots susceptibles de contenir des traces de colza T45

Cependant, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments, considérant que le pétitionnaire mentionne que les variétés de colza T45 ont été retirées du marché et que les lots susceptibles d'être importés ne contiendraient que des traces de ce colza génétiquement modifié, estime que, dans cette situation particulière, la consommation sporadique de tels lots de colza portant l'événement de transformation T45 ne présenterait pas de risque sanitaire pour l'homme et l'animal.

Pascale BRIAND