

# COMMISSION DU Génie BIOMOLECULAIRE

Paris, le 11 mai 2004

## AVIS

La Commission du génie biomoléculaire a été saisie, le 17 mars 2004, par les autorités compétentes françaises (Direction générale de l'alimentation) d'une demande d'avis relatif à un dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché d'un colza hybride génétiquement modifié, tolérant à l'herbicide glufosinate d'ammonium, en vue de la culture et de tout usage comme toute autre variété de maïs conventionnelle dans l'Union Européenne.

Un dossier initial relatif à “ **la DEMANDE DE MISE SUR LE MARCHE du colza génétiquement modifié Ms8, Rf3 et Ms8 x Rf3** ”, a été déposé en 1996 par BAYER CROPSCIENCE auprès des autorités compétentes belges sous la référence **C/BE/96/01**, dans le cadre de l'ancienne directive 90/220/CE. Conformément à l'article 35 de la directive 2001/18/CE, le demandeur a complété le dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché par les informations requises par la nouvelle directive qui concernent notamment les modalités d'identification de détection et de traçabilité de cet OGM, un plan de surveillance et de monitoring et la durée de l'autorisation demandée. Le dossier a également été actualisé par des informations récentes relatives à l'évaluation du risque de l'OGM.

La Commission du génie biomoléculaire réunie en séance plénière le 6 avril 2004, sous la présidence du Professeur Marc FELLOUS, a procédé à l'examen des compléments au dossier initial relatif à “ **la DEMANDE DE MISE SUR LE MARCHE du colza génétiquement modifié Ms8, Rf3 et Ms8 x Rf3** ”, déposés par BAYER CROPSCIENCE au titre de l'article 35 de la directive 2001/18/CE (partie C) ”.

La Commission du génie biomoléculaire a considéré les caractéristiques des séquences introduites et a procédé à l'évaluation des risques pour la santé et l'environnement.

### **1. Introduction**

Le dossier contient les nouvelles données complémentaires requises par les annexes de la directive 2001/18/CE relatives à l'évaluation de la sécurité sur la santé publique et l'environnement que présente l'OGM, qui ne figuraient pas dans le dossier initial de demande d'autorisation de mise sur le marché de la société BAYER CROPSCIENCE. Le rapport d'évaluation des autorités belges a été transmis avec le dossier scientifique. Cette évaluation se traduit par un avis favorable à l'importation des graines de colza, mais défavorable, dans l'état actuel du dossier, à la mise en culture du colza concerné.

### **2. Utilisation**

La demande d'autorisation porte sur la culture et l'utilisation des lignées génétiquement modifiée Ms8 et Rf3 ainsi que le l'hybride Ms8xRf3 et des variétés qui en dérivent, comme toute autre variété de colza conventionnelle.

### 3. Description du produit

La mise sur le marché concerne un système de contrôle de la stérilité mâle et de la restauration de la fertilité mâle transféré chez le colza (*Brassica napus*). Ce système est associé à une résistance à la matière active herbicide non sélective glufosinate d'ammonium. Ce système comporte l'utilisation de deux lignées parentales et de l'hybride correspondant.

Les plantes mâles stériles porteuses de l'évènement Ms8 portent les gènes :

- Bar de *Streptomyces hygroscopicus*, mis sous le contrôle d'un promoteur constitutif de riz, codant pour une Phosphinotricine Acétyl Transférase (PAT) qui détoxifie la Phosphinotricine, principe actif de l'herbicide glufosinate d'ammonium.
- Barnase, un gène de *Bacillus amyloliquefaciens* codant pour une ribonucléase, mis sous le contrôle d'un promoteur d'*Arabidopsis thaliana* dont l'expression est spécifique au tapis de l'anthere et qui bloque la production de pollen.

Les plantes mâles fertiles porteuses de l'évènement Rf3, restauratrices de la fertilité mâle des plantes porteuses de l'évènement MS8 portent les gènes :

- Bar de *Streptomyces hygroscopicus*, mis sous le contrôle d'un promoteur constitutif de riz, codant pour une Phosphinotricine Acétyl Transférase (PAT) qui détoxifie la Phosphinotricine, principe actif de l'herbicide glufosinate d'ammonium.
- Barstar, un gène de *Bacillus amyloliquefaciens* codant pour inhibiteur de la Barnase précédemment citée et qui restaure ainsi la fertilité pollinique.

Les hybrides Ms8xRf3 sont porteurs des deux évènements, et présentent une restauration de la fertilité pollinique, ainsi que deux copies du gène de résistance au glufosinate d'ammonium.

#### 3.1. Méthode de transformation

L'évènement de la lignée mâle stérile Ms8 a été obtenu par transformation avec *Agrobacterium tumefaciens* à l'aide du plasmide pTHW107.

L'évènement de la lignée restauratrice Rf3 a été obtenu par transformation avec *Agrobacterium tumefaciens* à l'aide du plasmide pTHW118.

L'hybride Ms8xRf3 est obtenu par croisement sexuée entre les deux lignées parentales Ms8 et Rf3.

#### 3.2. Description moléculaire et génétique

##### **a) les plasmides**

Le plasmide pTHW107 contient :

- Une cassette d'expression qui comprend la séquence du gène *barnase*, isolé de *Bacillus amyloliquefaciens* codant pour une ribonucléase et placé sous le contrôle du promoteur spécifique du tapis de l'anthere pTA29 provenant de *Nicotiana tabacum* et du terminateur de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*.
- Une cassette d'expression qui comprend la séquence du gène *bar*, isolé d'une souche du micro-organisme du sol *Streptomyces hygroscopicus*, codant pour la phosphinotricine acétyl transférase, et placé sous le contrôle du promoteur pSsu-Ara isolé d'*Arabidopsis thaliana* et du terminateur 3'g7 d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Le plasmide pTHW118 contient :

- Une cassette d'expression qui comprend la séquence du gène *barstar*, isolé de *Bacillus amyloliquefaciens* codant pour un inhibiteur de la barnase et placé sous le contrôle spécifique du tapis de l'anthere pTA29 provenant de *Nicotiana tabacum* et du terminateur de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*.
- Une cassette d'expression qui comprend la séquence du gène *bar*, isolé d'une souche du micro-organisme du sol *Streptomyces hygroscopicus*, codant pour la phosphinotricine acétyl transférase, et placé sous le contrôle du promoteur et placé sous le contrôle du promoteur pSsu-Ara isolé d'*Arabidopsis thaliana* et du terminateur 3'g7 d'*Agrobacterium tumefaciens*.

#### **b) construction génétique introduite dans l'OGM.**

Ms8 : le fragment d'ADN utilisé pour la transformation génétique est isolé du plasmide pTHW107 par restriction enzymatique. L'insertion est située au niveau d'un seul locus. Elle contient une copie intacte des cassettes d'expression des gènes *bar* et *barnase* et une copie tronquée. L'intégrité de la construction introduite a été vérifiée, ainsi que sa stabilité dans le génome de la plante.

Rf3 : le fragment d'ADN utilisé pour la transformation génétique est isolé du plasmide pTHW118 par restriction enzymatique. L'insertion obtenue est unique. Elle contient les cassettes d'expression des gènes *bar* et *barnstar* intactes. L'intégrité de la construction introduite a été vérifiée, ainsi que sa stabilité dans le génome de la plante.

### **4. Evaluation des risques pour la santé publique**

#### 4.1 expression des protéines d'intérêt

L'expression des gènes insérés dans différents tissus des plantes Ms8 et Rf3 a été effectuée par Northern Blot.

L'expression des gènes *barnase* et *barstar* n'est pas détectée dans les graines et le pollen. Dans les feuilles et les boutons floraux, l'expression de *barnase* dans Ms8 est sous la limite de détection (0.1pg/µg ARN total). L'expression de *barstar* dans Rf3 n'est détectée que dans les boutons floraux (entre 1.2 et 2.4 pg/µg ARN total).

L'expression du gène *bar* dans les feuilles et les boutons floraux varie entre 0.03 et 0.22 pg/µg ARN dans Ms8 et entre 0.2 et 1.1 pg/µg ARN total dans Rf3. Aucune expression du gène *bar* n'a été détectée dans le pollen.

La protéine PAT a également fait l'objet de dosages dans les graines et le pollen des lignées parentales et de l'hybride par la méthode ELISA. Dans les graines, le niveau d'expression est inférieur à 0.001% des protéines totales.

#### 4.2 toxicité des protéines d'intérêt et de l'OGM

Deux études ont été réalisées sur le lapin et serin, mais avec un événement de transformation différent (Ms1xRf1).

Une étude de tolérance alimentaire sur poulet sur 42 jours avec le colza Ms8xRf3 est mentionnée mais ne figure pas dans le dossier transmis.

Sur Ms8xRf3, seule une étude de digestibilité, réalisée sur lapin, est rapportée dans le dossier. Une moindre ingestion de la ration alimentaire des lapins nourris avec du colza est observée par rapport à ceux nourris sans colza est observée. Une moindre teneur en énergie digestible de l'OGM par rapport au colza non génétiquement modifié est également observé.

#### 4.4 analyse du risque allergénique

La comparaison de séquence de la protéine PAT avec celles d'allergènes connus n'a pas mis en évidence d'homologie de séquences ce qui tend à montrer une absence de risque d'une augmentation du potentiel allergène de ce maïs génétiquement modifié. Néanmoins, il conviendrait d'actualiser l'étude d'allergénicité de la protéine PAT.

#### 4.5 équivalence en substance

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

Les résultats présentés montrent parfois des différences selon les lignées maïs, en raison de la présentation peu claire des résultats statistiques, il n'est pas possible d'en conclure de manière définitive sur l'équivalence en substance.

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

### **5. Evaluation des risques pour l'environnement**

La stérilité mâle, ne semble pas présenter en tant que telle un risque pour l'environnement, tous les modèles prédisant la fixation rapide des facteurs de restauration face à une stérilité nucléaire. L'analyse ci-après décrit donc les impacts attendus en raison de la présence d'un gène de tolérance à un herbicide.

#### 5.1 Dissémination potentielle des gènes par le pollen ou par les graines

Le colza produit des petites graines en nombre important (de l'ordre d'un millier de graines par plante). Cette espèce présente un système mixte de reproduction avec une allogamie partielle suivant une voie anémophile et entomophile. On estime que, parmi les insectes, ce sont les abeilles qui sont le principal vecteur de pollen de colza. Les modalités de reproduction varient en fonction des conditions pédo-climatiques et des variétés.

##### **5.1.1 Dispersion du pollen**

La dispersion de pollen correspond chez le colza à une dynamique complexe. Le colza est partiellement allogame et, en moyenne, une plante de colza peut être fécondée à un taux de l'ordre de 30 % par un pollen produit par une autre plante de colza. Par ailleurs, 50 % du pollen émis par la plante se disperse dans un rayon de 3 m.

La dynamique de dispersion du pollen a pu être précisée par de nombreux travaux menés, en France et à l'étranger, à l'aide de dispositifs permettant de quantifier la contribution du pollen d'une parcelle " source " à la fécondation de plantes situées à une distance donnée de cette " source ". Ces travaux montrent une diminution des flux géniques avec la distance. Des études menées sur plusieurs milliers de m<sup>2</sup> en milieu continu ont montré que le taux de

graines issues d'une fécondation impliquant du pollen produit par une source donnée devenait inférieur à 1% au delà d'une distance de l'ordre de 30 m et était de l'ordre de 0,1 % au delà d'une centaine de mètres. Ce taux diminue ensuite très lentement avec la distance. Pour des plantes situées à plus d'un km de la source, des taux de fécondation inférieurs à 0,1 % mais non nuls sont observés.

La variabilité est très importante et le taux de pollinisation des plantes d'une parcelle par les plantes de parcelles environnantes dépend des quantités relatives de pollen de la parcelle réceptrice et des parcelles environnantes. Ainsi dépend-il notamment du rapport entre la taille de la source et la taille de la parcelle réceptrice, du synchronisme des floraisons et de la fertilité mâle des variétés. La dispersion du pollen sur de longues distances est aussi soumise à des facteurs variables parmi lesquels l'hétérogénéité du paysage (haies, rivières ...), les conditions climatiques, etc.

### **5.1.2 Dispersion des graines**

La dispersion de graines de colza intervient avant et pendant la récolte dans la parcelle de culture et lors du transport des graines entre la parcelle de culture et les silos de stockage.

#### *Dynamique des repousses dans les parcelles*

Le fonctionnement de ces populations de repousses de champ est désormais assez bien compris. Un volume important de graines (1000 à 6000 graines par m<sup>2</sup> soit environ 100 fois la dose de semis) reste sur le sol de la parcelle de culture après la récolte. Une fois profondément enfouies dans le sol, ces graines restent viables, éventuellement pendant plusieurs années (entre 5 et 10 ans en moyenne), et peuvent repousser dans les cultures de la rotation. Ces repousses constituent alors une nouvelle source potentielle d'émission de pollen et de graines. Le nombre de repousses par unité de surface est fonction notamment de l'humidité du sol et des pratiques agricoles à l'interculture. Leur taux de présence dans les cultures ultérieures de colza semblent diminuer avec la longueur de la rotation. L'effet du travail du sol a été évalué dans plusieurs études et il apparaît que les façons culturales superficielles favorisent la germination des graines restées au sol dès l'interculture qui suit la récolte. La persistance de ces graines est alors fortement réduite.

Dans le cas de variétés tolérantes à un herbicide, l'utilisation répétée de l'herbicide dans la rotation exerce une forte pression de sélection sur les plantes tolérantes. Il peut en résulter un accroissement du nombre de graines porteuses de la tolérance dans le sol et, de ce fait, un contrôle beaucoup plus difficile des repousses. Ce contrôle des repousses serait d'autant plus difficile à gérer par les agriculteurs que le caractère de tolérance introduit concernerait la tolérance à un herbicide déjà largement utilisé pour d'autres usages agricoles, ou un herbicide qui serait largement utilisé sur une autre plante de grande culture utilisée dans les mêmes rotations.

#### *Dispersion des graines hors des parcelles*

Il importe de prendre en compte quatre types différents de populations : les repousses en champs, les plantes cultivées, les populations férales et les repousses dans les jachères. En effet il existe des chevauchements dans les dates de floraison, donc de flux pollinique potentiel, entre ces quatre types de populations.

Certaines populations férales peuvent avoir une durée de vie assez longue et la présence de tolérance à un herbicide chez ces populations férales pourrait avoir pour effet d'augmenter la durée de vie de ces populations dans le cas d'une utilisation répétée de l'herbicide non sélectif.

#### ▪ **Production et valeur sélective d'hybrides interspécifiques**

Le colza est un hybride interspécifique naturel amphidiploïde ( $2n=38$ ) entre deux espèces diploïdes *Brassica oleracea* (un chou) et *Brassica rapa ssp campestris* (une navette). Il appartient à un complexe d'espèces phylogénétiquement proches les unes des autres ce qui

explique pourquoi des hybridations interspécifiques sont possibles. La probabilité de ces hybridations est fonction de plusieurs facteurs et, en particulier, de la présence et de la floraison conjointe des deux espèces parentales potentielles de l'hybride dans la zone considérée.

En ce qui concerne les deux espèces à l'origine du colza, *Brassica oleracea* et *Brassica rapa* ssp. *Campestris*, des hybridations avec le colza sont possibles. Toutefois, *Brassica rapa* n'est qu'une espèce occasionnelle dans la zone de culture du colza en France, elle n'est d'ailleurs pas considérée comme une mauvaise herbe de cette culture. De ce fait les hybridations qui ont été observées en Angleterre et dans certains pays du Nord de l'Europe sont très peu probables en France. Pour ce qui est des choux (*Brassica oleracea*) pour lesquels il existe une grande variabilité génétique, les hybridations ne sont pas toujours possibles. D'autre part, comme les formes cultivées sont maintenues au stade végétatif lors de leur culture, la probabilité d'hybridation est également très faible. Des formes spontanées de cette espèce sont connues mais leur aire de répartition en France est très limitée.

Pour les espèces présentes en France, le colza s'hybride rarement avec la ravenelle (*Raphanus raphanistrum*), encore plus rarement avec la roquette bâtarde (*Incana hirschfeldia*) et pas du tout, en conditions naturelles, avec la moutarde des champs (*Sinapis arvensis*).

L'hybridation entre le colza et la ravenelle est donc possible mais les fréquences obtenues sur le matériel étudié sont très faibles. En raison de leur plus faible valeur sélective, l'impact des hybrides interspécifiques dans les écosystèmes sera négligeable en l'absence de pression de sélection. Leur impact réel dépendra des pratiques agricoles et de l'usage des herbicides non sélectifs.

- **Autres impacts dans les agro-écosystèmes liés à la culture de colza génétiquement modifié tolérant à un herbicide**

*Impact sur la flore et la faune des écosystèmes agricoles*

Les impacts écologiques indirects liés aux évolutions possibles des flores adventices et des faunes associées et à la modification des quantités de résidus d'herbicides dans le milieu sont à prendre en compte dans le cas de l'utilisation potentielle sur des étendues agricoles importantes d'une ou plusieurs espèces de plantes tolérantes aux mêmes herbicides.

L'introduction de cultures tolérantes à un herbicide aboutit à des évolutions de flore et à des effets indirects sur la faune associée. Si le désherbage pratiqué sur la culture tolérante à un herbicide est plus efficace que le désherbage de la culture conventionnelle, ce qui est un des objectifs du produit, on observera, sur la parcelle cultivée et sa bordure immédiate une réduction de la flore adventice et des organismes qui y sont inféodés.

En raison de ces effets indirects, c'est à l'échelle des territoires, intégrant les parcelles cultivées et les espaces non cultivés, qu'un bilan global des impacts environnementaux doit être fait et qu'une gestion intégrée peut optimiser l'équilibre entre production agricole, impacts environnementaux et diversité biologique.

5.2 Sécurité pour les organismes non cibles

Comme indiqué dans l'analyse précédente, les impacts sur les organismes non-cibles sont indirects et liés essentiellement à l'utilisation de l'herbicide glufosinate-ammonium sur la culture de colza Ms8xRf3.

5.3 Conclusion

La Commission du génie biomoléculaire considère qu'en l'absence d'utilisation de l'herbicide concerné dans et hors de la sole cultivée, il n'existe pas de risque écologique direct (développement de plantes invasives per se) lié à la présence d'un gène de tolérance à un herbicide chez le colza (ou une espèce apparentée).

Néanmoins, comme l'intérêt de ces plantes tolérantes réside dans l'utilisation de l'herbicide correspondant, des effets indirects, d'importance variable, ont été identifiés et doivent impérativement être pris en compte :

- l'utilisation de l'herbicide concerné dans les cultures de la sole cultivée pourrait conduire à une augmentation de l'effectif des populations de repousses de colza dans les rotations culturales ;
- la pression de sélection exercée par les herbicides non spécifiques auxquels les plantes ont été rendues tolérantes, peut être très forte, en cas d'utilisation continue et incontrôlée de ces herbicides et conduire à la persistance d'événements rares comme la reproduction d'hybrides interspécifiques fertiles ;
- la modification du spectre d'herbicides utilisés devrait se traduire par une plus grande efficacité du désherbage et, comme toute modification de pratiques agricoles, entraîner des impacts indirects sur l'agro-écosystème, notamment en termes de modification de la flore adventice et de faune associée.

## **6. Monitoring et surveillance générale**

### 6.1 Surveillance spécifique

Le plan proposé vise :

- à confirmer que la culture de l'hybride Ms8xRf3 ne conduit pas au développement de repousses additionnelles ou de problèmes non gérables et que les recommandations en termes de management sont efficaces.
- à caractériser la présence de crucifères sexuellement compatibles et à évaluer le transfert éventuel de la tolérance à ces populations.

Le plan de monitoring prévoit de suivre pendant 5 années 20 sites en France, en Grande-Bretagne et en Allemagne. Sur chaque site, deux parcelles, OGM et non-OGM, seront suivies sur 20 placettes (1m x 1m) dans les parcelles et 20 placettes dans les bordures de champ.

La CGB considère que le plan de surveillance spécifique est cohérent avec l'analyse du risque pour l'environnement. Si le protocole affiché semble pertinent pour les repousses de colza, la sélection des placettes de crucifères adventices devrait se faire par un repérage ciblé de ces plantes dont la répartition n'est pas uniforme dans l'espace.

### 6.2 Surveillance générale

La surveillance générale prévoit de détecter tout effet négatif qui n'aurait pas été évalué a priori. Cette surveillance est prévue en étroite relation avec les réseaux existants.

Les modalités d'organisation du réseau doivent être précisées. Par ailleurs, il apparaît nécessaire que les autorités chargées de la surveillance biologique du territoire intervienne dans la coordination d'un tel réseau.

La Commission considère en outre que l'évolution des impacts environnementaux dépend largement des systèmes de culture, des pratiques agricoles et de leur évolution. Afin de pouvoir interpréter la contribution spécifique des colzas tolérants à un herbicide, la surveillance générale, devrait être très large et concerner également l'évolution des pratiques agricoles et d'indicateurs environnementaux à l'échelle des systèmes de culture.

## **7. Conclusions**

En ce qui concerne les risques pour la santé, la Commission du génie biomoléculaire considère que :

- en l'absence de données suffisantes concluant à l'équivalence en substance,
- en l'absence d'étude sur rat relative à la toxicité subchronique du colza Ms8xRf3,
- en l'absence des résultats de l'étude de tolérance alimentaire du colza Ms8xRf3 mentionnées dans le dossier,

elle n'est pas en mesure de se prononcer de manière définitive sur les risques pour la santé animale que pourrait constituer l'utilisation du colza Ms8xRf3.

Par ailleurs, la Commission du génie biomoléculaire estime souhaitable de disposer de l'actualisation de l'analyse des comparaisons de séquence de la protéine PAT.

En ce qui concerne les risques pour l'environnement, la Commission du génie biomoléculaire considère que la culture de colzas génétiquement modifiés tolérants à un herbicide ne présente pas de risques directs pour l'environnement, mais peut présenter des effets indirects liés à l'utilisation de l'herbicide non sélectif. En conséquence, la Commission du génie biomoléculaire considère que la culture de colzas Ms8xRf3 nécessite des modalités de gestion spécifique et de suivi afin de maîtriser les impacts écologiques indirects et les impacts agronomiques liés à la présence de repousses dans les systèmes de culture.

La Commission du génie biomoléculaire recommande la mise en place d'une démarche d'évaluation continue fondée sur une diffusion limitée de colzas tolérants à un herbicide, accompagnée d'un diagnostic préalable des situations rencontrées et de l'élaboration de mesures adaptées à ces situations ainsi que d'une validation de l'efficacité de ces mesures au travers d'une biovigilance étroite.

La Commission du génie biomoléculaire considère que les modalités de gestion et de biovigilance décrites dans le dossier ne sont pas assez précises pour évaluer leur adéquation avec les effets indirects identifiés dans le cadre de l'évaluation des risques. Elle estime que les informations suivantes sont nécessaires pour compléter son évaluation :

- les modalités précises de l'introduction de la culture de colza Ms8xRf3
- les modalités précises d'organisation du réseau de surveillance générale.
- un protocole de surveillance générale permettant d'interpréter la contribution spécifique des colzas tolérants à un herbicide, aux impacts environnementaux identifiés ci-dessus. Cette surveillance générale devrait concerner l'évolution des pratiques agricoles et d'indicateurs environnementaux à l'échelle des systèmes de culture.
- en ce qui concerne la surveillance spécifique, les modalités de sélection des placettes de crucifères adventices.

**Le Président**

*signé*

**Marc FELLOUS**