

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 30 mars 2023

## **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  
NS-B50027-4 développé pour avoir un profil modifié en acides gras  
et pour être tolérant au glufosinate-ammonium, pour l'importation, la  
transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM  
(dossier n° EFSA-GMO-NL-2019-160)**

---

*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 à 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 publiés sur son site internet.*

---

L'Anses a été saisie le 24 mai 2022 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) pour la réalisation de l'expertise suivante : « Demande d'avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003, du colza génétiquement modifié NS-B50027-4 développé pour avoir un profil modifié en acides gras et pour être tolérant au glufosinate-ammonium, pour l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2019-160) ».

## 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 - European Food Safety Authority (EFSA) - 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'EFSA permet cependant aux États membres de faire connaître leurs observations sur les dossiers initiaux. Dans ce cadre, la DGCCRF a sollicité l'avis de l'Anses sur ce dossier initial, vis-à-vis des exigences de la réglementation applicable sur ce dossier.

Le Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 s'applique pour ce dossier.

## 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 réalisée par le Groupe de Travail (GT) « Biotechnologie », réuni les 15 juin, 7 juillet, 3 août et 16 novembre 2022 sur la base de rapports initiaux rédigés par neuf rapporteurs. Elle a été conduite en se basant sur les documents guide de l'EFSA et du panel GMO de l'EFSA ainsi que sur les éléments complémentaires jugés nécessaires par les experts du GT « Biotechnologie ».

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet : <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

## 3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT

Les sections telles que définies dans le formulaire de commentaires de l'EFSA sont utilisées ci-dessous.

### A. Informations générales

Le colza (*Brassica napus*) est une brassicacée annuelle à fleurs jaunes issue du croisement naturel entre un chou (*B. oleracea*) et une navette (*B. rapa*). En 2021, les dix premiers pays producteurs de colza sont la Chine, le Canada, l'Inde, l'Australie, l'Allemagne, la France, la Pologne, l'Ukraine, la Russie, et la Roumanie, qui représentent environ 84,7 % de la production mondiale, estimée à plus de 71 333 434 tonnes (selon FAOStat<sup>1</sup>). En 2019, 27 % du colza cultivé était génétiquement modifié (selon le rapport de l'ISAAA<sup>2</sup> de 2019). Les importations en Europe de colza génétiquement modifié proviennent principalement du Canada, d'Australie et dans une moindre mesure des États-Unis (Sohn *et al.*, 2021).

<sup>1</sup> <http://www.fao.org/faostat/en/#home>

<sup>2</sup> International service for the acquisition of agri-biotech applications (<https://www.isaaa.org/resources>)

Le colza est l'une des principales cultures destinées à la production d'huile en Europe. Seule la graine de colza est utilisée, et transformée principalement en huile et en tourteau, co-produit de l'extraction de l'huile. L'huile de colza est utilisée pour l'alimentation humaine et animale ou pour la production de biocarburants, et le tourteau de colza est utilisé en alimentation animale. Toutes les variétés de colza destinées à l'alimentation humaine sont dites « double zéro », c'est-à-dire pauvres en acide érucique et pauvres en glucosinolates.

Le colza NS-B50027-4 a été génétiquement modifié afin d'exprimer sept gènes codant cinq désaturases ( $\Delta 12$ -désaturase,  $\omega 3$ - $\Delta 15$ -désaturase,  $\Delta 6$ -désaturase,  $\Delta 5$ -désaturase,  $\Delta 4$ -désaturase) et deux élongases ( $\Delta 6$ -élongase,  $\Delta 5$ -élongase). Les enzymes codées par ces gènes convertissent séquentiellement l'acide oléique (C18:1 n-9), naturellement présent dans le colza, en acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6 n-3). L'unique vecteur plasmidique d'expression contient, en plus de ces 7 gènes, le gène codant la phosphinothricine-N-acétyltransférase (*pat*), enzyme conférant une tolérance à l'herbicide glufosinate-ammonium. Cette tolérance est utilisée comme marqueur de sélection au cours de la transformation génétique. Ainsi, le colza NS-B50027-4 produit dans la fraction lipidique de ses graines, trois acides gras polyinsaturés n-3 à longue chaîne ( $\geq C20$ ) ( $\omega 3$  LC-PUFA) : l'acide eicosapentaénoïque (EPA), l'acide docosapentaénoïque (DPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA).

Le pétitionnaire a développé le colza génétiquement modifié NS-B50027-4 synthétisant du DHA et de l'EPA dans ses graines afin de proposer une source alimentaire alternative de ces acides gras. Les sources de DHA et EPA pour l'alimentation humaine et animale (notamment en aquaculture) proviennent habituellement de poissons ou d'algues.

Ce dossier correspond à une première demande d'autorisation de mise sur le marché pour l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale du colza génétiquement modifié NS-B50027-4. Il ne concerne pas sa mise en culture. Pour rappel, toutes les denrées alimentaires destinées à la consommation humaine ou animale dans l'Union européenne (UE) sont soumises à une limite maximale pour les résidus (LMR) de produits phytopharmaceutiques afin de protéger la santé animale et humaine (Règlement (CE) n°396/2005).

## **B. Informations scientifiques**

### **B.1. Identification et caractérisation des dangers**

#### **B.1.1. Informations concernant les plantes réceptrices ou (le cas échéant) parentales**

La transformation génétique a été réalisée sur le colza (*Brassica napus*) non transgénique de variété AV Jade, colza de printemps adapté à la culture en Australie, aux Etats-Unis et au Canada.

Le pollen de colza présente différentes voies naturelles de dispersion, notamment le vent et les insectes. Le pétitionnaire indique que le vent peut engendrer une dispersion du pollen potentiellement fécondant jusqu'à 1,5 km de la plante « mère », mais le GT « Biotechnologie » rappelle que des études de terrain font état de distances de dispersion de pollen fécondant (évalué en utilisant des résistances aux herbicides comme marqueurs génétiques du flux de gènes) pouvant aller jusqu'à 3 km (Cai *et al.*, 2008 ; Rieger *et al.*, 2001).

Le GT « Biotechnologie » remarque également qu'une grande diversité d'insectes sont aussi capables de disperser le pollen de colza. Du pollen fécondant peut être déposé par les insectes pollinisateurs de grande taille à plus de 1 km de la plante d'origine (Chifflet, 2011). Par ailleurs, des études ont montré la capacité du colza féral à se maintenir à long terme, parfois jusqu'à huit ans (Pessel, 2001), ce qui n'est pas envisagé par le pétitionnaire dans le dossier.

Parmi les espèces taxonomiquement proches du colza avec la compatibilité sexuelle la plus élevée, *B. rapa* (qui est auto-incompatible), *B. oleracea* et *B. juncea* (qui sont fortement auto-compatibles) sont présentes en Europe. Des variétés de *B. juncea* sont notamment cultivées en France pour leur utilisation dans la fabrication de moutarde.

**Le GT « Biotechnologie » demande que le pétitionnaire analyse la littérature concernant la biologie de l'espèce, notamment la biologie de la reproduction de *Brassica napus*, sa survie et sa dispersion, afin d'évaluer les conséquences possibles d'une dissémination accidentelle de graines de colza génétiquement modifié NS-B50027-4. Les points à considérer sont la capacité à s'établir et à passer l'hiver, la capacité à se reproduire et à se croiser avec des plantes compatibles, ainsi que la capacité à former des populations férales (EFSA, 2010a ; Anses, 2023).**

### B.1.2. Caractérisation moléculaire

#### B.1.2.1. Informations concernant la modification génétique

La transformation génétique a été effectuée à l'aide d'une méthode médiée par *Agrobacterium tumefaciens* AGL1, précédemment développée par le pétitionnaire (Petrie *et al.* 2012 ; Petrie *et al.* 2014 ; Ruiz-Lopez *et al.* 2014). Des pétioles cotylédonaire prélevés sur des plantules de la variété AV Jade ont servi d'explants primaires pour la transformation. Après co-culture avec la souche d'*Agrobacterium tumefaciens*, les explants ont été cultivés sur milieu de sélection contenant du glufosinate-ammonium jusqu'à la production de cals, puis transférés pour régénération de bourgeons avant excision et transfert sur un milieu d'allongement. Les plantes T0 ont été rempotées et amenées à maturité pour la production de graines T1.

La transformation a été réalisée avec le vecteur binaire pJP3416\_GA7-ModB portant huit cassettes d'expression entre les bordures gauche et droite d'un seul ADN-T. Elles visent à permettre l'expression des protéines suivantes :

- la  $\Delta 12$ -désaturase de la levure *Lachancea kluyveri* qui catalyse la conversion de l'acide oléique (C18:1 n-9) en acide linoléique (C18:2 n-6) ;
- la  $\omega 3$ - $\Delta 15$ -désaturase de la levure *Pichia pastoris* qui catalyse la conversion de l'acide linoléique (C18:2 n-6) en acide alpha-linolénique (C18:3 n-3) ;
- la  $\Delta 6$ -désaturase de l'algue verte *Micromonas pusilla* qui catalyse la conversion de l'acide alpha-linolénique (C18:3 n-3) en acide stéaridonique (SDA, C18:4 n-3) ;
- la  $\Delta 6$ -élongase de la micro-algue *Pyramimonas cordata* qui catalyse la conversion de l'acide stéaridonique (SDA, C18:4 n-3) en acide eicosatétraénoïque (C20:4 n-3) ;
- la  $\Delta 5$ -désaturase de la micro-algue *Pavlova salina*, qui catalyse la conversion de l'acide eicosatétraénoïque (ETA, C20:4 n-3) en acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 n-3) ;
- la  $\Delta 5$ -élongase de la micro-algue *Pyramimonas cordata* qui catalyse la conversion de l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 n-3) en acide docosapentaénoïque (C22:5 n-3) ;
- la  $\Delta 4$ -désaturase de la micro-algue *Pavlova salina* qui catalyse la conversion de l'acide docosapentaénoïque (C22:5 n-3) en acide docosahéxaénoïque (DHA, C22:6 n-3) ;
- la phosphinothricine N-acétyltransférase (PAT) issue de la bactérie *Streptomyces viridochromogenes* qui permet d'acétyler le glufosinate-ammonium, conférant ainsi au colza NS-B50027-4 une tolérance à cet herbicide. Cette tolérance a été utilisée comme marqueur de sélection au cours de la transformation génétique.

Les séquences codantes des différents gènes ont été optimisées pour tenir compte de l'usage préférentiel des codons chez le colza. Le Tableau 1 résume le contenu des différentes cassettes d'expression présentes dans l'ADN-T.

**Tableau 1 :** Informations concernant les gènes d'intérêt, l'organisme donneur de chaque transgène et les séquences non codantes présentes dans la cassette d'expression.

Gène	Organisme donneur du transgène	Contenu de la cassette d'expression (en plus de la séquence codante indiquée dans la 1 <sup>ère</sup> colonne)
<i>Lackl-Δ12D</i> Gène codant la Δ12-désaturase	<i>Lachancea kluyveri</i>	Promoteur du gène de la conline 1 de <i>Linum usitatissimum</i> ; enhancer du virus de la mosaïque du tabac 59 ; terminateur du gène de la conline 1 de <i>Linum usitatissimum</i> .
<i>Picpa-ω3D</i> Gène codant l' ω3-/Δ15-désaturase	<i>Pichia pastoris</i>	Promoteur du gène de la conline 1 de <i>Linum usitatissimum</i> ; enhancer du virus de la mosaïque du tabac 59 ; terminateur du gène de la conline 1 de <i>Linum usitatissimum</i> .
<i>Micpu-Δ6D</i> Gène codant la Δ6-désaturase	<i>Micromonas pusilla</i>	Promoteur du gène de la conline 2 de <i>Linum usitatissimum</i> ; enhancer du virus de la mosaïque du tabac 59 ; terminateur du gène de la conline 2 de <i>Linum usitatissimum</i> .
<i>Pyrco-Δ6E</i> Gène codant la Δ6-élongase	<i>Pyramimonas cordata</i>	Promoteur du gène de l'élongase d'acide gras 1 d' <i>Arabidopsis thaliana</i> ; enhancer du virus de la mosaïque du tabac 59 ; terminateur du gène de la lectine de <i>Glycine max</i> .
<i>Pavsa-Δ5D</i> Gène codant la Δ5-désaturase	<i>Pavlova salina</i>	Promoteur du gène de la napine de <i>Brassica napus</i> ; enhancer du virus de la mosaïque du tabac 59 ; terminateur du gène de la nopaline synthase d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
<i>Pyrco-Δ5E</i> Gène codant la Δ5-élongase	<i>Pyramimonas cordata</i>	Promoteur du gène de l'élongase d'acide gras 1 d' <i>Arabidopsis thaliana</i> ; enhancer du virus de la mosaïque du tabac 59 ; terminateur du gène de la lectine de <i>Glycine max</i> .
<i>Pavsa-Δ4D</i> Gène codant la Δ4-désaturase	<i>Pavlova salina</i>	Promoteur du gène de la conline 2 de <i>Linum usitatissimum</i> ; enhancer du virus de la mosaïque du tabac 59 ; terminateur du gène de la conline 2 de <i>Linum usitatissimum</i> .
<i>pat</i> Gène codant la phoshinothricine N-acétyltransférase (PAT)	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Promoteur constitutif du gène de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur ; terminateur du gène de la nopaline synthase d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .

#### B.1.2.2. Informations concernant la plante génétiquement modifiée

Les insertions d'ADN exogène issu du vecteur binaire pJP3416\_GA7-ModB ont été caractérisées par séquençage NGS (Next Generation Sequencing) de l'ADN de deux lignées de génération T3 et de six lignées de génération T4 (dérivées de deux autres lignées T3) du colza NS-B50027-4 et comparaison de séquences avec le génome de référence de *Brassica napus*, variété Darmor. Les résultats montrent la présence de séquences de l'ADN-T en deux loci distincts, sur les chromosomes A02 et A05. L'insert présent dans le chromosome A02 (12110 pb) contient seulement un ADN-T partiel avec quatre des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras, tandis que l'insert présent dans le chromosome A05 (46614 pb) correspond à une double insertion de l'ADN-T complet, en orientation inversée. Les séquences codantes insérées sont identiques à celles de l'ADN-T présent dans le vecteur binaire d'origine. Par analyse en Southern blot sur les générations T4, T6 et T8, le pétitionnaire a vérifié que le colza NS-B50027-4 ne contient pas de séquences issues du vecteur plasmidique, ni de gène de résistance aux antibiotiques.

L'analyse de l'insert dans le chromosome A02 a porté sur un total de 15004 pb (12110 pb issues de l'ADN-T et 2894 pb du génome de colza). Ses régions flanquantes ont été caractérisées (2089 pb en amont et 805 pb en aval). Les cassettes d'expression complètes (promoteur, séquence codante et terminateur) des gènes *Micpu-Δ6D*, *Pyrco-Δ5E*, *Pavsa-Δ5D* et *Picpa-ω3D* ont été retrouvées mais pas celles des gènes *Pavsa-Δ4D*, *Lackl-Δ12D* et *Pyrco-Δ6E*, ni *PAT*. L'analyse du site d'insertion révèle par ailleurs une délétion de 15 pb du génome de colza, dans la région 3'UTR de l'ORF (*open reading frame*, cadre ouvert de lecture) putatif du gène *hpp* codant une protéine de fonction inconnue.

L'analyse de l'insert dans le chromosome A05 a porté sur un total de 49789 pb (46614 pb issues de l'ADN-T et 3175 pb du génome de colza). Ses régions flanquantes ont été caractérisées (1159 pb en amont et 2016 pb en aval). Deux groupes complets des huit gènes de l'ADN-T ont été insérés avec une orientation inversée (RB-LB/LB-RB). Une séquence palindromique de 156 pb (LB/LB) lie les 2 groupes de gènes, flanqués de 40 pb de la bordure droite en amont et de 42 pb de la bordure droite en aval. De plus, l'analyse révèle une délétion de 20 pb du génome de colza, dans le deuxième exon de l'ORF putatif du gène *pti* (Pto-interacting protein 1-like gene). Chez la tomate, la protéine PTI est une sérine-thréonine kinase. La protéine PTI ferait partie d'une cascade de phosphorylation impliquée dans un mécanisme de défense suite à l'agression par un agent pathogène (Zhou *et al.*, 1995). La fonction de la protéine PTI n'a pas encore été caractérisée chez le colza.

Le GT « Biotechnologie » considère que l'absence de comparaison entre les séquences des deux sites d'insertion dans le colza NS-B50027-4 et celles de l'ADN génomique de la variété de colza parentale AV Jade (variété utilisée pour la transformation génétique) ne permet pas de confirmer les délétions au niveau des deux sites d'insertion de l'ADN-T. De plus, le GT « Biotechnologie » considère que ces comparaisons de séquence permettraient de confirmer l'existence des gènes *hpp* et *pti* dans le génome du colza parental AV Jade et leurs mutations dans le colza NS-B50027-4.

**Le GT « Biotechnologie » demande que le pétitionnaire vérifie l'expression des gènes *hpp* et *pti* dans le colza AV Jade et démontre que leurs niveaux d'expression dans différents tissus végétaux ne sont pas modifiés par la transformation génétique conduisant au colza NS-B50027-4.**

En absence des anticorps *ad hoc*, l'expression des huit protéines dans le colza DHA a été quantifiée par une technique LC-MS/MS (couplage chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse « multiple reaction monitoring »). Cette méthode a été mise au point par le pétitionnaire (Colgrave *et al.*, 2019a). Dans l'article de Colgrave *et al.* (2019 a), il est indiqué que l'expression des sept enzymes de la voie du DHA présentes dans le colza NS-B50027-4 dans les différents tissus végétaux ne sont pas détectables en dehors de la graine. Ceci est cohérent avec la régulation de ces sept gènes par des promoteurs spécifiques des tissus de la graine. La protéine PAT est exprimée de manière constitutive dans tous les tissus. L'article de Colgrave *et al.* (2019a) recherche l'expression des huit protéines nouvellement exprimées dans les graines matures et immatures de colza NS-B50027-4, dans celles de colzas portant seulement un des deux inserts en A02 ou en A05 et dans celles du colza témoin parental AV Jade. Comme attendu, le colza parental AV Jade n'exprime aucune des protéines exogènes. Le colza NS-B50027-4 et celui portant l'insert en A05 expriment les huit protéines exogènes sauf dans les graines matures où l'enzyme PYRSCO-Δ6E est non quantifiable. Le colza portant l'insert en A02 exprime les quatre protéines dont les gènes sont présents dans ce locus.

En raison d'une grande variabilité entre les mesures individuelles pour chaque protéine et entre les trois sites, le GT « Biotechnologie » ne peut pas identifier s'il existe un effet cumulatif dans l'expression des protéines correspondantes aux copies surnuméraires des gènes *Micpu-Δ6D*, *Pyrco-Δ5E*, *Pavsa-Δ5D* et *Picpa-ω3D* présentes dans le colza NS-B50027-4 (portant les deux inserts en A02 et en A05) en comparaison du colza génétiquement modifié portant uniquement l'insert en A05 (Colgrave *et al.*, 2019a).

Le pétitionnaire présente des données incomplètes sur une évaluation de l'effet de chacun des deux inserts sur la synthèse du DHA dans le colza génétiquement modifié (protocoles non présentés). Il indique que des colzas non transgéniques ont été croisés avec le colza NS-B50027-4 de génération T3 pour développer des lignées portant un seul des deux inserts en A02 ou en A05. La teneur en DHA aurait été mesurée dans les graines de ces différents colzas. Les colzas non génétiquement modifiés et le colza portant uniquement l'insert en A02 ne produisent pas de DHA. Les deux colzas portant uniquement l'insert en A05 produisent 4,5 % de DHA par rapport aux acides gras totaux de la graine. Selon le pétitionnaire, la présence des deux inserts, en A02 et en A05, dans le colza NS-B50027-4 conduit à la production de 9 à 10 % de DHA par rapport aux acides gras totaux de la graine.

Dans le dossier, les niveaux d'expression des huit protéines nouvellement produites par le colza NS-B50027-4, traité ou non avec du glufosinate-ammonium en plus des traitements conventionnels, ont été mesurés sur des échantillons de tissus récoltés aux USA et au Canada en 2020, en utilisant la méthode décrite dans l'article de Colgrave *et al.* (2019a). Les quatre sites de prélèvement choisis étaient représentatifs de la distribution géographique et des conditions agro-environnementales de culture du colza en Amérique du Nord. Les échantillons de tissus ont été prélevés à cinq stades différents permettant la récolte de feuilles, racines, graines immatures, graines matures et plantes entières. Seule la protéine PAT a été recherchée dans l'ensemble des tissus végétaux prélevés, les sept protéines de la voie de biosynthèse du DHA l'étant uniquement dans les graines immatures et matures.

En dehors de la protéine PYRSCO-Δ6E non quantifiable dans les graines matures, les six autres enzymes ont été mesurées et la protéine PAVSA-Δ4D présente la teneur moyenne la plus élevée. Colgrave *et al.* (2019a) indiquent toutefois que le contenu pour les deux élongases PYRSCO-Δ6E et PYRSCO-Δ5E serait sous-estimé du fait de la technique d'extraction. Dans les graines immatures, les sept enzymes de la voie de biosynthèse du DHA (y compris la protéine PYRSCO-Δ6E) sont exprimées. En se basant sur la moyenne des mesures, l'ordre des niveaux d'expression des sept enzymes est différent de celui des graines matures et la protéine PYRSCO-Δ5E y est la plus exprimée. Toutefois, la variabilité entre les mesures individuelles pour toutes les enzymes est très importante et la comparaison des moyennes des niveaux d'expression des sept enzymes est peu informative.

La protéine PAT est quantifiable dans tous les tissus de la plante et à tous les stades de développement. Les expressions maximales pour la protéine PAT se retrouvent dans les graines immatures et dans les racines. Dans les colzas NS-B50027-4 traités au glufosinate-ammonium en plus des traitements conventionnels, la protéine PAT est présente à  $575,17 \pm 171,31$  ng/mg de protéines dans les graines immatures et à  $338,68 \pm 267,55$  ng/mg de protéines dans les racines. Dans les graines matures, la protéine PAT est présente à  $106,36 \pm 33,95$  ng/mg de protéines soit, après calcul et ajustement,  $39,20 \pm 16,62$  μg/g de matière sèche.

Seules les graines matures seront à l'origine des denrées et aliments pour animaux en Europe. Le tableau 2 présente les teneurs en protéines exogènes dans les graines matures de colza NS-B50027-4 ayant subi ou non un traitement au glufosinate-ammonium en plus des traitements conventionnels. Il a été vérifié qu'aucune des protéines exogènes n'est mesurable dans les graines de colza témoin AV Jade.

**Tableau 2 :** Moyennes et écarts-types des teneurs en protéines mesurées dans les graines matures de colza NS-B50027-4, non traité ou traité au glufosinate-ammonium, ajustées en considérant une efficacité d'extraction de 77 %, et exprimées en µg/g de matière sèche (n=20 ; ND = non détectable)

Protéine exogène	Lackl- Δ12D	Picpa- ω3D	Micpu- Δ6D	Pyrco- Δ6E	Pavsa- Δ5D	Pyrco- Δ5E	Pavsa- Δ4D	PAT
Colza non traité Moyenne (Ecart-type)	207,82 (92,60)	421,20 (168,26)	47,07 (28,10)	ND	261,12 (179,39)	158,81 (75,07)	1144,50 (885,91)	40,69 (14,31)
Colza traité Moyenne (Ecart-type)	194,68 (70,82)	416,43 (109,29)	50,55 (29,70)	ND	216,95 (72,87)	132,62 (60,67)	911,62 (187,84)	39,20 (16,62)

Les niveaux d'expression de chaque protéine dans les graines matures ne sont pas significativement modifiés selon le traitement ou non de la plante avec du glufosinate-ammonium. Ces résultats ne mettent pas en évidence un effet du traitement au glufosinate-ammonium sur l'expression des huit protéines.

Deux études de ségrégation des deux insertions, A02 et A05, ont été réalisées sur la base de l'analyse des descendants F2 des croisements du colza NS-B50027-4 de génération T5 avec une lignée de colza non transgénique (deux lignées testées) et des croisements du colza NS-B50027-4 de générations T3 ou T7 avec une lignée de colza non transgénique (deux lignées testées) ou avec la lignée parentale AV Jade. Pour chacun des deux inserts, les proportions génotypiques observées sont cohérentes avec la ségrégation mendélienne attendue.

La stabilité génétique des deux inserts de l'ADN-T dans le génome du colza NS-B50027-4, en A02 et en A05, a été confirmée au sein des générations T3, T6 et T8 par Southern blot. La stabilité phénotypique basée sur la tolérance au glufosinate-ammonium a été démontrée dans toutes les plantes de colza NS-B50027-4 de trois générations différentes (T3, T5 et T7).

#### B.1.2.4. Conclusions de la caractérisation moléculaire

Le GT « Biotechnologie » considère que les résultats présentés dans le dossier démontrent la stabilité génotypique et phénotypique des inserts dans le colza NS-B50027-4 et ne soulèvent pas de question liée à l'utilisation de ce colza en alimentation animale ou humaine. Néanmoins, le GT « Biotechnologie » demande que le pétitionnaire analyse les séquences de jonction dans le génome de colza de la variété parentale AV Jade au niveau des deux loci d'insertion (A02 et A05), et confirme ainsi l'existence des gènes *hpp* et *pti* et leurs niveaux d'expression. Le GT demande que les effets de la transformation génétique sur l'expression de ces deux gènes de colza soient aussi recherchés dans le colza NS-B50027-4.

### B.1.3. Evaluation comparative

#### B.1.3.1. Choix de l'équivalent non transgénique et des comparateurs supplémentaires

Les analyses comparatives ont été réalisées avec des graines de colza NS-B50027-4 de génération T8. Le comparateur non-transgénique est la lignée qui a été utilisée pour la transformation, la variété AV Jade, variété isogénique du colza NS-B50027-4. Le panel de variétés commerciales de référence, non-OGM, contient 4 variétés australiennes et 2 variétés canadiennes (représentatives des zones de culture envisagées).

Les lots de graines du colza NS-B50027-4 ont été produits aux États-Unis en 2019, tandis que les lots de graines du témoin isogénique de variété AV Jade ont été produits en Australie en 2018. Le GT « Biotechnologie » demande l'utilisation de matériels génétiques produits dans des conditions environnementales similaires, conformément aux recommandations de l'EFSA (EFSA, 2015).

**Le GT « Biotechnologie » demande que le pétitionnaire décrive précisément ces deux lieux de production et leurs conditions pédoclimatiques et, le cas échéant, démontre que les conditions de production différentes des graines n'ont pas d'incidence sur les analyses comparatives présentées.**

#### B.1.3.2. Dispositif expérimental et analyse statistique des données issues des essais au champ pour l'analyse comparative

Les expérimentations ont été conduites sur onze sites en 2020. Huit sites étaient situés dans quatre États des États-Unis et trois sites étaient situés dans deux provinces du Canada. L'ensemble de ces onze sites ont subi des prélèvements mais l'analyse de composition a été réalisée pour seulement huit de ces sites. Les trois autres sites n'ont pas été retenus pour des raisons de représentativité géographique ; ces dernières sont jugées recevables par le GT « Biotechnologie ». Sur chaque site, un plan d'expérience en blocs randomisés à quatre répétitions a été utilisé et quatre variétés commerciales ont été cultivées sur chaque site (trois variétés étant communes à tous les sites). La variété génétiquement modifiée, le colza NS-B50027-4, a de plus été cultivée avec ou sans traitement au glufosinate-ammonium en plus des traitements conventionnels.

Le colza NS-B50027-4 (traité ou non avec du glufosinate-ammonium) est comparé à la variété témoin isogénique par des tests de différence et aux variétés commerciales de référence par des tests d'équivalence. L'erreur de type 1 retenue par le pétitionnaire est de 10 % pour les tests de différence et de 5 % pour les tests d'équivalence. Le modèle statistique utilisé est un modèle linéaire à effets mixtes incluant un effet fixe « génotype ». Les effets aléatoires retenus sont « sites », « bloc dans site » et « variété commerciale ». Un modèle est également utilisé pour étudier l'interaction génotype/site. Les résultats des tests statistiques sont interprétés selon l'approche décrite par le Panel GMO de l'EFSA (2010b), en classant les variables en quatre catégories selon les résultats des tests d'équivalence et sept types après combinaison avec les résultats des tests de différence.

L'ensemble des modèles et méthodes est décrit dans les annexes. Les données brutes sont fournies sous format électronique. Les caractéristiques du plan d'expérience et de l'analyse statistique respectent les recommandations du panel GMO de l'EFSA (EFSA, 2010b).

**Cependant, le GT « Biotechnologie » demande que les différents programmes informatiques d'analyse statistique manquants soient fournis dans le dossier, conformément au document guide du panel GMO de l'EFSA (EFSA, 2010b).**

Le colza NS-B50027-4, le colza isogénique de variété AV Jade et les variétés de référence mises en œuvre sont des variétés de printemps. La précocité et la durée du cycle des plantes étant des paramètres importants afin d'évaluer la capacité de reproduction de plantes férales qui seraient issues de dispersion non-intentionnelle des graines, **le GT « Biotechnologie » demande que la précocité et la durée du cycle des plantes soient exprimées en degrés-jours et non en nombre de jours, afin de pouvoir être transposées aux conditions européennes.**

#### B.1.3.3. Sélection du matériel et des composés pour analyse

L'analyse de la composition a été réalisée uniquement sur les graines matures. Les analyses de composition respectent les lignes directrices de l'OCDE pour le colza (OCDE, 2011) à l'exception de l'analyse des acides gras de C6 à C12, non fournie par le pétitionnaire. **Le GT « Biotechnologie » demande que le pétitionnaire fournisse les données de l'analyse comparative pour les teneurs en acides gras de C6 à C12, ou justifie leur absence.**

#### B.1.3.4. Analyse comparative de la composition

Les mesures de 57 composés sur 88 analysés dans la graine ont été disponibles pour l'analyse statistique, 31 composés ayant été considérés comme non-utilisables car plus de 33 % des données obtenues pour chacun de ces paramètres étaient inférieures à leur limite de quantification : 19 acides gras, 9 glucosinolates, le sodium et les bêta et delta-tocophérols.

L'analyse comparative des graines de colza de référence et de colza témoin isogénique AV Jade avec les graines de colza NS-B50027-4 traité ou non traité au glufosinate-ammonium révèle respectivement 18 et 13 composés classés en type 5 (non équivalence probable avec les variétés de référence et non différence avec la variété isogénique AV Jade), type 6 (non équivalence probable avec les variétés de référence et différence avec la variété isogénique AV Jade) ou type 7 (non équivalence avec les variétés de référence et différence avec la variété isogénique AV Jade) tels que définis par le panel GMO de l'EFSA (EFSA, 2010b).

Sur la base de ces résultats, l'analyse combinée de l'ensemble des 8 sites d'expérimentation montre que :

- la composition des graines de colza NS-B50027-4 non traité avec du glufosinate-ammonium est statistiquement de :
  - type 5 pour la teneur en tocophérols totaux ;
  - type 6 pour
    - les teneurs moyennes en fibres brutes et en humidité,
    - les teneurs moyennes en trois minéraux (potassium, phosphore et fer) ;
  - type 7 pour
    - les teneurs moyennes en cendres et en acides gras bruts,
    - les teneurs moyennes en quatre acides gras [acide oléique (C18:1 n-9), acide linoléique (C18:2 n-6), acide alpha-linolénique (C18:3 n-3) et somme des C18 :1],
    - la teneur moyenne en une substance antinutritionnelle (sinapine).

- la composition des graines de colza NS-B50027-4 traité avec du glufosinate-ammonium est statistiquement de :
  - o type 6 pour
    - les teneurs moyennes en fibres brutes, en protéines et en humidité,
    - les teneurs moyennes en minéraux (potassium et fer),
    - les teneurs moyennes en trois acides aminés (tyrosine, glycine, acide aspartique),
    - la teneur moyenne en acide arachidique (C20:0),
    - la teneur moyenne en gamma-tocophérol ;
  - o type 7 pour
    - les teneurs moyennes en cendres et en acides gras bruts,
    - la teneur moyenne en phosphore,
    - les teneurs moyennes en quatre acides gras (acide oléique (C18:1n-9), acide linoléique (C18:2 n-6), acide alpha-linolénique (C18:3 n-3) et le total des C18 :1],
    - la teneur moyenne en une substance antinutritionnelle (sinapine).

Le pétitionnaire considère que les non-équivalences et les différences de composition des graines de colza NS-B50027-4 sont faibles et biologiquement non significatives, la moyenne obtenue pour la plante génétiquement modifiée étant comprise entre les valeurs minimales et maximales des variétés de référence. Le GT « Biotechnologie » considère que ces arguments sont insuffisants pour démontrer que, en dehors des différences attendues de teneurs en acides gras, les différences de composition observées sont biologiquement non significatives.

**Le GT « Biotechnologie » demande que, en dehors des différences attendues pour les teneurs en acides gras, les différences et les non-équivalences de composition observées (types 5 à 7) entre les graines de colza NS-B50027-4 et les graines de colza témoin et de référence soient discutées sur le plan biologique.**

#### B.1.3.5. Analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques

L'étude des taux de germination des lots de graines utilisés pour l'analyse comparative montre un taux plus faible pour le colza NS-B50027-4 en comparaison de la variété isogénique AV Jade. Les caractéristiques agronomiques et phénotypiques ont été évaluées pour 16 paramètres.

L'analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques des plantes de colza NS-B50027-4 révèle six paramètres agronomiques et phénotypiques classés en type 6 ou type 7 tels que définis par le panel GMO de l'EFSA (EFSA, 2010b). Les paramètres concernés sont de :

- type 6 pour la densité finale de plantes et le score de verse,
- type 7 pour la densité initiale de plantes, la vigueur végétative, le nombre de graines par silique et le rendement.

Des résultats similaires sont obtenus que le colza NS-B50027-4 soit traité ou non au glufosinate-ammonium en plus des traitements conventionnels.

Le GT « Biotechnologie » observe que :

- le colza NS-B50027-4 présente des densités initiales et finales de plantes plus faibles,
- la vigueur végétative initiale est meilleure mais le rendement final est moindre,
- le nombre de graines par siliques est également plus faible,
- le risque de verse est moins élevé, ce qui est cohérent avec une plus faible densité et une moindre hauteur des plantes.

Le pétitionnaire considère que les non-équivalences et les différences identifiées sont biologiquement non significatives, la moyenne obtenue pour la plante génétiquement modifiée étant comprise entre les valeurs minimales et maximales des variétés commerciales. Bien que les différences observées ne soient pas toujours significatives dans les tests statistiques effectués site par site, un même sens de variation est systématiquement observé. Le GT « Biotechnologie » considère que les arguments du pétitionnaire sont insuffisants pour démontrer que les différences observées sont biologiquement non significatives et considère que cette interprétation ne correspond pas aux lignes directrices de l'EFSA (EFSA, 2015) qui recommandent de chercher à expliquer les différences de réponses entre sites.

**Le GT « Biotechnologie » demande que les différences et les non-équivalences agronomiques et phénotypiques observées (types 6 et 7) entre le colza NS-B50027-4 et les colzas témoin et de référence soient discutées sur le plan biologique.**

#### B.1.3.6. Effets de la transformation

Le pétitionnaire a réalisé un essai au champ spécifique en Australie en 2015 afin de préparer en conditions pilote, des produits alimentaires issus des graines de colza NS-B50027-4 non traité au glufosinate-ammonium et de colza témoin isogénique de la variété AV Jade. Les produits alimentaires sont deux types de tourteaux (tourteaux obtenus par pression dits « tourteaux gras » et tourteaux extraits à l'hexane) et trois types d'huile [huile brute, huile extraite à l'hexane et huile raffinée, blanchie et désodorisée (huile RBD)]. Les analyses sont ensuite réalisées selon les lignes directrices de l'OCDE (OCDE, 2011). La recherche des huit protéines issues de la transformation génétique n'a pas été faite dans les produits.

Comme attendu en raison de la transformation génétique, des différences de composition en acides gras sont observées entre les tourteaux ou les huiles issus de graines de colza NS-B50027-4 et ceux issus de graines de variété AV Jade. Les profils en acides gras dans les tourteaux et les huiles sont présentés dans les tableaux 3 et 4, respectivement.

**Tableau 3 :** Profil en acides gras des tourteaux issus de graines de colza NS-B50027-4 et AV Jade. Les valeurs sont exprimées en % de matière sèche (LOQ : limite de quantification).

	Aliment	Tourteaux « gras »		Tourteaux extraits à l'hexane	
		Variété	NS-B50027-4	AV Jade	NS-B50027-4
	<b>Acide gras</b>				
Acides gras totaux		13,96	18,34	0,18	0,53
	C14:0	0,01	0,02	< LOQ	< LOQ
Acide palmitique	C16:0	0,69	0,086	0,02	0,04
Acide palmitoléique	C16:1 n-7	0,06	0,08	< LOQ	< LOQ
Acide stéarique	C18:0	0,31	0,39	< LOQ	< LOQ
	C18:1 total	5,82	10,82	0,08	0,29
	C18:2 total	1,21	3,66	0,01	0,12
Acide alpha-linolénique	C18:3 n-3	3,03	1,99	0,02	0,04
Acide stéaridonique (SDA)	C18:4 n-3	0,44	0,02	< LOQ	< LOQ
	C20:0	0,08	0,09	< LOQ	< LOQ
	C20:1 n-9	0,15	0,17	< LOQ	< LOQ
	C20:2 n-6	0,01	0,01	< LOQ	< LOQ
	C20:3 n-3	0,09	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Acide eicosatétraénoïque (ETA)	C20:4 n-3	0,18	0,01	< LOQ	< LOQ
Acide eicosapentaénoïque (EPA)	C20:5 n-3	0,07	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	C22:0	0,04	0,04	< LOQ	< LOQ
	C22:5 n-3	0,17	0,01	< LOQ	< LOQ
Acide docosahexaénoïque (DHA)	C22:6 n-3	1,31	0,06	< LOQ	< LOQ
	C24:0	0,01	0,02	< LOQ	< LOQ

**Tableau 4 :** Composition en acides gras des huiles issues de colzas NS-B50027-4 et AV Jade. Les valeurs sont exprimées en % des acides gras totaux.

	Aliment	Huile brute		Huile extraite à l'hexane		Huile RBD	
	Variété	NS-B50027-4	AV Jade	NS-B50027-4	AV Jade	NS-B50027-4	AV Jade
	<b>Acide gras</b>						
Acides gras trans totaux		0,894	0,084	0,953	0,105	1,095	0,283
	C14:0	0,069	0,066	0,087	0,085	0,072	0,067
Acide palmitique	C16:0	4,229	4,072	4,921	4,642	4,317	4,075
Acide palmitoléique	C16:1 n-7	0,165	0,150	0,315	0,315	0,170	0,155
Acide stéarique	C18:0	2,210	2,140	2,095	2,155	2,260	2,150
Acide oléique	C18:1 n-9	41,516	59,137	37,022	55,236	42,470	59,274
Acide linoléique	C18:2 n-6	8,234	18,310	8,477	19,695	8,350	18,215
Acide alpha-linolénique	C18:3 n-3	21,770	10,990	21,635	10,870	21,385	10,655
Acide stéaridonique (SDA)	C18:4 n-3	2,390	0,079	3,115	0,133	2,280	0,075
	C20:0	0,582	0,452	0,560	0,474	0,592	0,455
	C20:1 n-9	1,180	0,982	1,105	0,935	1,215	0,992
	C20:2 n-6	0,088	0,058	0,090	0,065	0,087	0,058
	C20:3 n-3	0,655	0,026	0,660	0,034	0,645	0,024
Acide eicosatétraénoïque (ETA)	C20:4 n-3	1,370	0,045	1,290	0,054	1,315	0,043
Acide eicosapentaénoïque (EPA)	C20:5 n-3	0,491	0,023	0,482	0,022	0,462	0,019
	C22:0	0,235	0,174	0,222	0,193	0,239	0,179
	C22:5 n-3	1,101	0,039	1,248	0,053	1,024	0,034
Acide docosahexaénoïque (DHA)	C22:6 n-3	8,955	0,245	9,320	0,354	8,065	0,214
	C24:0	0,083	0,096	0,086	0,110	0,088	0,094

En dehors de la présence vraisemblable des huit protéines nouvellement exprimées dans les graines de colza NS-B50027-4 (non recherchées), le GT « Biotechnologie » considère que la composition des tourteaux extraits à l'hexane est similaire à celle de ce même type de tourteau produit avec des graines de la variété de colza AV Jade. En revanche, les tourteaux obtenus par pression présentent une proportion de glucides et de lipides différentes selon qu'ils sont obtenus à partir de graines de colza NS-B50027-4 ou de graines de colza de variété AV Jade. Ces différences pourraient s'expliquer par des niveaux d'extraction d'huile variables mais rendent difficile la comparaison entre les tourteaux issus de graines de colza NS-B50027-4 et de colza AV Jade.

**Pour les tourteaux obtenus par pression (« tourteaux gras »), le GT « Biotechnologie » demande que le pétitionnaire précise si les différences de composition observées sont dues à une différence d'efficacité du procédé d'extraction entre les tourteaux issus des graines des deux variétés ou d'une différence de composition liée à la variété de colza.**

L'analyse comparative des huiles obtenues à partir des graines de colza NS-B50027-4 ou de colza de variété AV Jade confirme les différences de composition en acides gras attendues en raison de la transformation génétique. En particulier, on note pour les huiles issues des graines de colza NS-B50027-4, une forte diminution de la teneur en acides gras précurseurs (acide oléique et acide linoléique) et une augmentation d'acides gras polyinsaturés n-3 (SDA, ETA, EPA et DHA). Toutefois, la teneur en acides gras *trans* totaux dans les huiles extraites de graines de colza NS-B50027-4 est aussi supérieure à celle observée dans les huiles extraites des graines de colza de la variété AV Jade.

Le GT « Biotechnologie » demande que :

- la différence de teneur en acides gras *trans* totaux dans l'huile RBD (huile consommée en alimentation humaine) issue de graines de colza NS-B50027-4 soit analysée vis-à-vis des risques nutritionnels,
- pour les tourteaux et pour les huiles, les sommes des teneurs en acides gras polyinsaturés n-3 et n-6, et le rapport de ces sommes soient présentés et analysés,
- le dossier soit complété par :
  - o les données de composition des graines de colza des deux variétés de colza utilisées pour préparer les produits alimentaires ;
  - o des précisions du pétitionnaire sur le devenir des différents composés présents initialement dans les graines et leur répartition dans les tourteaux et les huiles ;
  - o des arguments sur les phénomènes d'oxydation ou d'hydrogénation potentiels des acides gras polyinsaturés dans les tourteaux gras et les huiles issus de graines de colza NS-B50027-4 en raison de leur composition en acides gras modifiée. Les précautions d'emploi et de conservation de ces produits alimentaires devraient être précisées en raison de l'instabilité éventuelle des acides gras polyinsaturés.

Les teneurs en vitamine K1 et en vitamine E dans les trois types d'huile sont également fournies par le pétitionnaire et présentées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Teneurs en vitamine K1 et en vitamine E des huiles issues des graines de colzas NS-B50027-4 et AV Jade. Les valeurs sont exprimées en mg pour 100 g de matière sèche.

	Huile brute		Huile extraite à l'hexane		Huile RBD	
	NS-B50027-4	AV Jade	NS-B50027-4	AV Jade	NS-B50027-4	AV Jade
Vitamine K1	0,070	0,056	0,253	0,192	0,060	0,035
Alpha tocophérol	26,8	23,7	53,2	31,5	18,3	10,3
Gamma tocophérol	54,8	48,9	63,8	52,7	36,8	28,1
Delta tocophérol	0,427	0,765	0,700	0,795	0,399	0,575
Vitamine E (tocophérols totaux)	82,0	73,3	118,5	85,1	55,1	39,0

Les teneurs moyennes en vitamine E sont modifiées. Les teneurs moyennes en alpha- et gamma-tocophérols sont augmentées et celles en delta-tocophérol sont diminuées dans les huiles issues de graines de colza NS-B50027-4 par rapport aux huiles issues de graines de colza de variété AV Jade.

Les teneurs moyennes en vitamine K1 sont aussi supérieures dans les huiles issues de graines de colza NS-B50027-4 par rapport aux huiles issues de graines de colza de variété AV Jade (25 % pour l'huile brute, 32 % pour l'huile extraite à l'hexane, 71 % pour l'huile RBD). Une augmentation de la consommation de vitamine K1 peut modifier l'INR (*International normalized ratio*, mesure indicative de la coagulation sanguine) des patients sous traitement par antivitamine K, une vigilance particulière devrait être associée à la consommation d'huiles issues de graines de colza NS-B50027-4 par ces personnes.

#### B.1.3.7. Conclusions de l'évaluation comparative

Le pétitionnaire conclut que le colza NS-B50027-4 est équivalent au colza témoin AV Jade et aux variétés de référence, à l'exception des modifications du profil en acides gras en accord avec la transformation génétique. Il en déduit qu'aucune étude supplémentaire n'est nécessaire. Bien que cette différence de profil en acides gras soit l'objectif recherché par le pétitionnaire, le colza NS-B50027-4 n'est pas équivalent aux variétés de référence et est différent du colza témoin AV Jade sur le plan de la composition des graines. De plus, le colza NS-B50027-4 n'est pas équivalent aux variétés de référence et est différent du colza témoin AV Jade, aussi sur le plan agronomique et phénotypique.

**Le GT « Biotechnologie » considère qu'une évaluation nutritionnelle chez une espèce cible est nécessaire pour renseigner la sécurité liée à la consommation du colza NS-B50027-4.**

#### B.1.4. Toxicologie

##### B.1.4.1. Analyse des protéines nouvellement exprimées

Le colza NS-B50027-4 est modifié génétiquement dans le but d'exprimer huit protéines exogènes, la protéine PAT et sept protéines impliquées dans la conversion séquentielle de l'acide oléique en DHA. Un argumentaire relatif à l'historique d'utilisation des huit protéines nouvellement exprimées est fournie par le pétitionnaire. Il indique notamment que toutes les enzymes de la voie du DHA nouvellement exprimées dans le colza NS-B50027-4 sont homologues aux désaturases ou élongases universellement présentes dans l'alimentation humaine, et que la protéine PAT a déjà été introduite dans plusieurs plantes génétiquement modifiées autorisées sur le marché sans qu'aucun effet sur la santé humaine ou animale n'ait été rapporté.

Les données de sécurité toxicologique sur les organismes sources, les recherches bioinformatiques d'homologies de séquences entre les huit protéines et des séquences d'allergènes et de toxines connus, la dégradabilité des protéines par les enzymes digestives, la thermosensibilité des protéines et la teneur des huit protéines nouvellement exprimées dans les graines et différents produits alimentaires ainsi que l'analyse faite par le GT « Biotechnologie » sont détaillées dans les sections sur l'allergénicité (section B.1.5), sur la caractérisation moléculaire de la plante génétiquement modifiée (section B.1.2.2) et sur les effets de la transformation (section B.1.3.6).

Le pétitionnaire indique par ailleurs ne pas pouvoir réaliser d'études de toxicité orale à doses répétées pendant 28 jours chez le rongeur avec chacune des sept protéines intervenant dans la biosynthèse du DHA dans la mesure où la synthèse et la purification des protéines nouvellement exprimées dans le colza NS-B50027-4 sous forme fonctionnelle dans des systèmes cellulaires sont complexes et que le niveau d'expression de ces sept protéines dans le colza NS-B50027-4 est trop faible pour pouvoir en purifier une quantité suffisante.

**Le GT « Biotechnologie » suggère la réalisation d'une étude de toxicité par administration orale répétée pendant 28 jours chez le rongeur avec la graine de colza NS-B50027-4 *a minima*, en remplacement d'une étude de toxicité sur chacune des protéines purifiées. Cette étude permettrait de pallier les difficultés de production individuelle des sept protéines nouvellement exprimées dans le colza, et également d'évaluer les effets de leurs interactions éventuelles.**

#### B.1.4.2. Analyse des nouveaux constituants autres que les protéines

La voie de biosynthèse des acides gras polyinsaturés à longue chaîne exprimée dans les graines de colza NS-B50027-4 modifie la composition lipidique des graines de colza. La composition des graines est discutée au chapitre B.1.3.4.

Le pétitionnaire a réalisé une évaluation de l'innocuité d'une huile RBD produite à partir de graines de colza NS-B50027-4 traité au glufosinate-ammonium par administration orale (par gavage) à doses répétées pendant 28 jours chez le rat. Les groupes témoins recevaient soit un régime sans huile, soit de l'huile de maïs, soit de l'huile RBD produite à partir de graines de colza témoin AV Jade. La dose retenue pour l'étude était de 5 g d'huile par kg de poids corporel et par jour. Chaque groupe incluait 10 mâles et 10 femelles, soit un total de 80 animaux. Une diminution du cholestérol est observée chez les animaux recevant l'huile RBD produite à partir de graines de colza NS-B50027-4. Pour le même régime, le pétitionnaire indique également une diminution du taux de globuline sanguin chez les mâles, et une augmentation du nombre de globules rouges, de l'hémoglobine et de l'hématocrite chez les femelles. Des différences biologiques statistiquement significatives sont observées.

Le pétitionnaire fournit les données individuelles de l'étude mais ne fournit pas les données historiques du centre investigateur sur une période de temps couvrant l'année de l'étude (2021) et pour la même espèce animale. L'imputabilité des effets observés à la consommation d'huile RBD issue de graines de colza NS-B50027-4 ne peut être écartée faute de pouvoir finaliser l'expertise.

**Le GT « Biotechnologie » demande que les données historiques du centre investigateur soient fournies par le pétitionnaire.**

#### B.1.4.3. Informations sur les constituants modifiés des denrées alimentaires et des aliments pour animaux

Une étude a été conduite en 2015 pour préparer des produits semblables à ceux destinés à l'alimentation animale et humaine dans des conditions pilote : deux types de tourteaux et trois types d'huile. L'analyse de cette étude par le GT est disponible au chapitre B.1.3.6.

#### B.1.4.4. Analyse de l'aliment (denrée alimentaire ou aliment pour animaux) génétiquement modifié entier

Le pétitionnaire présente les résultats d'une étude de toxicité subchronique menée pendant 90 jours chez le rat, testant séparément des régimes contenant de l'huile RBD ou des tourteaux issus de graines de colza NS-B50027-4. Cette étude a été menée entre 2017 et 2018 selon un protocole s'appuyant sur la ligne directrice OCDE 408 (OCDE, 1998). Le pétitionnaire a choisi de ne tester pour chaque produit qu'une seule dose en s'appuyant sur les lignes directrices de l'EFSA (EFSA, 2014).

Six groupes de 10 rats mâles et 10 rats femelles ont été nourris avec des régimes alimentaires constitués comme suit :

- un régime témoin ;
- un régime complété par 20 % d'huile de maïs ;
- un régime complété par 20 % d'huile issue de graines de colza de variété AV Jade ;
- un régime complété par 20 % d'huile issue de graines de colza NS-B50027-4 ;
- un régime complété par 20 % de tourteaux issus de graines de colza de variété AV Jade ;
- un régime complété par 20 % de tourteaux issus de graines de colza NS-B50027-4.

Le GT « Biotechnologie » considère que cette étude de toxicité subchronique ne peut être prise en compte en raison de :

- l'absence d'information sur le traitement au glufosinate-ammonium des plantes de colza NS-B50027-4 cultivées pour la production des graines ;
- l'absence des bulletins d'analyse permettant de vérifier l'équivalence nutritionnelle des aliments distribués ;
- l'absence de recherche de l'ensemble des mycotoxines réglementées en dehors des aflatoxines B1, B2, G1, G2 ;
- la mise en œuvre d'une seule dose dans les régimes distribués (20 % d'huile ou 20 % de tourteau de colza) et la non-justification du choix de ces doses ;
- le faible nombre de rats par groupe (10 rats par sexe), l'Anses (Anses, 2011a) préconisant un nombre de 20 mâles et 20 femelles par groupe ;
- l'absence de calcul de puissance et la non-présentation des programmes statistiques utilisés,
- l'absence des données historiques du centre investigateur qui ne permet pas d'appréhender les variations des paramètres observés.

Par ailleurs, le GT « Biotechnologie » souligne l'absence d'une analyse statistique de chacun des différents types de produits (huiles et tourteaux) qui permettrait une meilleure discrimination d'éventuelles différences.

**Le GT « Biotechnologie » demande la fourniture d'une étude de toxicité subchronique par voie orale pendant 90 jours chez le rat répondant pleinement aux exigences du Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013, réalisée avec un aliment contenant simultanément des tourteaux et une part d'huile, ou des graines de colza NS-B50027-4.**

#### B.1.4.5. Conclusions de l'évaluation toxicologique

L'évaluation des éléments présentés sur la sécurité des huit protéines nouvellement exprimées ne met pas en évidence d'informations conduisant à suspecter un effet toxique sur la santé humaine et animale. Toutefois, aucune étude de toxicité par administration répétée pendant 28 jours chez le rongeur n'a été conduite sur les protéines nouvellement exprimées, leur synthèse ou leur purification en quantité suffisante n'étant pas jugée possible par le pétitionnaire.

Le GT « Biotechnologie » suggère la réalisation d'une étude de toxicité par administration orale répétée pendant 28 jours chez le rongeur avec la graine de colza NS-B50027-4 *a minima*, en remplacement d'une étude de toxicité sur des protéines purifiées. Cette étude permettrait de pallier les difficultés de production individuelle des huit protéines nouvellement exprimées dans le colza, et également d'évaluer les effets de leurs interactions éventuelles.

Le GT « Biotechnologie » n'est pas en mesure de se prononcer sur la sécurité du colza NS-B50027-4 sur la base de l'étude de toxicité orale subchronique pendant 90 jours présente dans le dossier.

### B.1.5. Evaluation de l'allergénicité

#### B.1.5.1. Évaluation de l'allergénicité de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s)

Le potentiel allergénique des huit protéines nouvellement exprimées dans le colza NS-B50027-4 a été évalué selon les critères d'évaluation de l'allergénicité recommandés par l'EFSA (EFSA, 2017a), à savoir :

- l'innocuité des sources de protéines exprimées dans la plante génétiquement modifiée ;
- l'absence d'homologies de séquences entre ces protéines et des allergènes ou toxines connus lorsque la recherche est effectuée avec l'algorithme FASTA et des fenêtres glissantes de 80 et 8 résidus ;
- la dégradation des protéines exprimées par la pepsine et la trypsine dans des tests de digestions gastrique et intestinale simulées ;
- la thermorésistance des protéines exprimées,
- la faible teneur en protéines nouvellement exprimées dans la plante génétiquement modifiée.

Selon le pétitionnaire, aucun des organismes sources des séquences codant les différentes protéines nouvellement exprimées n'est à l'origine de réactions allergiques. Le GT « Biotechnologie » note par ailleurs que l'American Type Culture Collection (ATCC) classe les levures *Lanchancea kluyveri* et *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) dans la catégorie *Biosafety Level 1* et que les micro-algues *Pavlova salina*, *Micromonas pusilla* et *Pyramimonas cordata* sont classées comme non toxiques par l'Australian National Algae Culture Collection.

S'agissant des analyses bio-informatiques effectuées par le pétitionnaire, l'analyse effectuée ne révèle pas de motifs épitopiques dans les protéines ou les fragments protéiques putatifs correspondant aux ORFs générés dans les bordures 5' et 3' de l'insert ou dus à des réarrangements de l'insert. Aucune identité globale (> 35 % d'identités sur une fenêtre glissante de 80 acides aminés) ni locale (100 % d'identités sur une fenêtre glissante de 8 acides aminés) n'est identifiée entre les séquences des huit protéines nouvellement exprimées dans le colza NS-B50027-4 et des séquences de protéines toxiques ou allergiques avérées et répertoriées dans des bases de données actualisées en 2021.

La recherche de peptides immunotoxiques potentiels associées à la maladie cœliaque a été réalisée par le pétitionnaire en utilisant la banque AllergenOnline. Cette recherche n'a donné aucun résultat positif pour les huit protéines nouvellement exprimées dans le colza NS-B50027-4. Le GT « Biotechnologie » note néanmoins que la stratégie de recherche des identités de séquences avec des peptides immunotoxiques avérés préconisée par l'EFSA (EFSA, 2017a) demande de tenir compte :

- de la désamination de la glutamine en acide glutamique qui intervient dans les motifs immunotoxiques ;
- du caractère dégénéré des motifs immunotoxiques, qui tolèrent de nombreuses mutations sur certains sites ;
- de la présence de motifs plus courts tels que ELPY ou ESPV ;
- de la possibilité d'introduire un nombre limité de mésappariements,

sans supprimer l'interaction des peptides immunotoxiques avec la corbeille du CMH-II des HLA-DQ2 et HLA-DQ8.

Lorsque ces conditions sont réunies, le GT « Biotechnologie » identifie que la protéine PAT présente six peptides putatifs dont deux possèdent le motif modifié ELPA, deux possèdent le motif modifié ESPV et deux possèdent le motif modifié ELPF. Toutefois, l'existence dans ces peptides de sites de clivage par la trypsine et/ou la présence en position 4 ou 6 d'un acide glutamique n'est guère compatible avec une activité immunotoxique. L'analyse du docking moléculaire de ces 6 peptides dans la corbeille des HLA-DQ2 et HLA-DQ8 ne montre pas d'interaction susceptible de déclencher une réponse immunotoxique ou inflammatoire. Le GT « Biotechnologie » n'identifie pas de motifs térapeptidiques pour les sept autres protéines nouvellement exprimées.

**Le GT « Biotechnologie » considère que les huit protéines nouvellement exprimées dans le colza NS-B50027-4 ne présentent pas d'identités fonctionnelles avec les peptides immunotoxiques responsables de la maladie cœliaque.**

Les sept enzymes nouvellement synthétisées par le colza NS-B50027-4 impliquées dans la synthèse du DHA sont des enzymes à localisation membranaire comportant 4 à 8 segments transmembranaires. Cette localisation rend difficile l'isolement de ces protéines, recombinantes ou natives, sous une forme correctement repliée. Il est donc difficile de produire des anticorps polyclonaux pour reconnaître les enzymes non dégradées et les produits de la protéolyse digestive simulée *in vitro* de ces enzymes. Une approche basée sur le dosage par spectrométrie de masse quantitative (LC-MS/MS) des produits de la protéolyse pepsique (pH 1,2) et trypsique (pH 8,5) (Colgrave *et al.*, 2019b) a été utilisée par le pétitionnaire. L'ensemble des résultats pour les différentes enzymes membranaires, dont deux ont été confortés par une approche classique en SDS-PAGE avec coloration au Bleu de Coomassie et Western blot, montre qu'entre 93 % et 97 % des enzymes sont dégradées après 60 min d'incubation en conditions de protéolyses pepsique (SGF) et trypsique (SIF) simulées *in vitro*. Concernant la résistance de la protéine PAT à la protéolyse *in vitro*, le pétitionnaire se limite à rappeler des résultats issus de la littérature (Hérouet, 2005) qui montrent une dégradation rapide de la protéine en conditions de protéolyses pepsique et trypsique simulées *in vitro*.

**Le GT « Biotechnologie » considère que les résultats obtenus montrent que les enzymes exprimées dans le colza NS-B50027-4 sont rapidement dégradées en condition de digestion gastrique et intestinale simulées *in vitro* et qu'elles n'offrent donc qu'une résistance limitée à la protéolyse.**

De plus, après chauffage à différentes températures (37 °C, 55 °C, 75 °C et 90 °C), la résistance à la dénaturation thermique des différentes enzymes est estimée en mesurant les quantités de peptides tryptiques libérés. Les différentes enzymes membranaires exprimées dans le colza NS-B50027-4 ne sont pas totalement dégradées après chauffage de 30 min à 90 °C. La protéine PAT est en revanche thermosensible.

**Le GT « Biotechnologie » considère que les teneurs en protéines nouvellement produites par le colza NS-B50027-4 sont très faibles en comparaison de la teneur totale en protéines des graines du colza NS-B50027-4.**

**Le GT « Biotechnologie » considère que les protéines nouvellement exprimées dans le colza NS-B50027-4, satisfont globalement aux différents critères d'évaluation de l'allergénicité proposés par l'EFSA (EFSA, 2017a) et peuvent donc être considérées comme étant peu allergéniques.**

#### B.1.5.2. Évaluation de l'allergénicité de la plante génétiquement modifiée entière

Les informations disponibles ne laissent pas supposer que le colza transgénique NS-B50027-4 puisse développer une allergénicité différente de celle des variétés de colza non génétiquement modifiées.

#### B.1.5.3. Propriété d'adjuvant

Les informations disponibles ne laissent pas supposer que les huit protéines nouvellement exprimées dans le colza NS-B50027-4 puissent développer des propriétés adjuvantes.

#### B.1.5.4. Conclusions de l'évaluation de l'allergénicité

A partir des données et des commentaires fournis par le pétitionnaire, le potentiel allergénique des huit protéines nouvellement exprimées dans le colza NS-B50027-4 peut être considéré comme très faible sur la base des critères d'évaluation retenus par l'EFSA (EFSA, 2017a). Selon ces données, ces protéines n'ont apparemment pas de propriétés adjuvantes ni de propriétés immunotoxiques vis-à-vis de malades souffrant de maladie cœliaque. Enfin, l'allergénicité du colza NS-B50027-4 est probablement similaire à celle d'un colza conventionnel.

### B.1.6. Evaluation nutritionnelle

#### B.1.6.1. Évaluation nutritionnelle des denrées alimentaires génétiquement modifiées

Les acides gras polyinsaturés n-3 présents dans l'huile de colza NS-B50027-4 sont majoritairement le C18:3 n-3 (acide alpha-linolénique, ALA) et le C22:6 n-3 (acide docosahexaénoïque, DHA). La comparaison de profils en acides gras n-3 entre l'huile de colza NS-B50027-4 et différentes huiles contenant des acides gras n-3 (lin, poissons, crustacés et microalgues) ne permet pas d'identifier une huile qui lui soit similaire.

**Le GT « Biotechnologie » propose qu'une réflexion soit menée pour savoir si l'huile de colza NS-B50027-4 est équivalente à d'autres denrées alimentaires consommées en Europe ou est à considérer en tant que potentiel nouvel aliment au titre du Règlement (UE) 2015/2283.**

#### B.1.6.2. Évaluation nutritionnelle des aliments pour animaux génétiquement modifiés

Le colza NS-B50027-4 étant différent de son témoin isogénique AV Jade et non-équivalent aux variétés commerciales, une évaluation nutritionnelle chez une espèce cible est nécessaire pour renseigner la sécurité du colza NS-B50027-4. Le pétitionnaire fournit un article scientifique (Ruyter, 2019) présentant une étude nutritionnelle sur le saumon, réalisée en Australie (à 16 °C) et en Norvège (à 12 °C). Dans le cas présent, le saumon peut être considéré comme une espèce cible adaptée. Le GT « Biotechnologie » estime néanmoins que les résultats présentés dans cet article scientifique ne sont pas recevables en l'absence des données brutes et des analyses statistiques détaillées et explicites.

**Le GT « Biotechnologie » demande que le pétitionnaire fournisse les données brutes de cette étude nutritionnelle et justifie le choix d'analyses statistiques variables en fonction du site d'étude ou qu'il transmette les résultats d'une autre étude nutritionnelle sur une espèce cible.**

## **B.2. Évaluation de l'exposition - Prédiction de la quantité consommée ou de l'étendue de l'utilisation**

Le pétitionnaire présente des évaluations des expositions alimentaires au colza NS-B50027-4 chez l'animal et chez l'humain. L'huile de colza NS-B50027-4 serait destinée à l'alimentation humaine et aux poissons d'élevage comme source d'EPA et de DHA. Le tourteau délipidé issu de graines de colza NS-B50027-4 aurait une utilisation en alimentation animale habituelle, le pétitionnaire estimant qu'après l'extraction par solvant, le tourteau issu de graines de colza NS-B50027-4 ne serait pas différent d'autres tourteaux issus de colzas non génétiquement modifiés.

Concernant l'alimentation humaine, l'Anses (Afssa, 2010 ; Anses, 2011b) recommande à la population adulte générale de consommer 500 mg d'EPA+DHA par jour. Le pétitionnaire rappelle que l'EFSA recommande à cette même population de consommer 250 mg d'EPA+DHA par jour (EFSA, 2010c) et que des études en alimentation humaine (EFSA, 2012) ont montré que des apports supplémentaires à long terme d'EPA et de DHA combinés jusqu'à environ 5 g par jour ne semblent pas avoir d'effets indésirables sur la santé humaine. Aucune dose maximale tolérable d'EPA, de DHA ou de DPA n'a encore été fixée par un organisme faisant autorité en Europe (EFSA, 2012).

Le pétitionnaire présente une modélisation réalisée en remplaçant de l'huile de Menhaden – ayant obtenu le statut GRAS en 2018 (FDA GRAS Notice No.GRN 000105) – par de l'huile de colza issue de graines de colza NS-B50027-4. L'huile issue de graines de colza NS-B50017-4 contenant 10 % de DHA+EPA+DPA, soit environ la moitié de la teneur de l'huile de Menhaden, les calculs d'exposition seraient environ la moitié de ceux déterminés pour l'huile de Menhaden, qui supposaient de manière conservatrice que tous les produits alimentaires contenaient de l'huile de Menhaden. Avec cette approche, l'exposition moyenne à l'huile de Menhaden était de 14 g par personne et par jour pour les personnes de plus de 2 ans, et une exposition associée au DHA+EPA de 2,8 g par personne et par jour. Si cette même évaluation est appliquée à l'huile issue de graines de colza NS-B50027-4, l'exposition associée au DHA+EPA+DPA serait de 1,4 g par personne de plus de 2 ans et par jour. Ce chiffre est inférieur à l'apport maximal de 5 g par personne et par jour pour les adultes déterminé par l'EFSA (EFSA, 2012). Le pétitionnaire rapporte également une modélisation alimentaire pour le pire scénario de remplacement de 100 % de l'huile de colza ou de 100 % de l'huile de colza et 30 % de toute autre huile végétale par de l'huile de colza issue de graines de colza NS-B50027-4 dans les régimes alimentaires de l'Australie et de la Nouvelle-Zélande, réalisée par la FSANZ<sup>3</sup> (FSANZ, 2017). Aucune préoccupation pour les régimes alimentaires australien et néo-zélandais n'a été mise en évidence avec cette approche. La modélisation réalisée par la FSANZ est représentative d'un régime occidental, qui serait analogue à tout régime européen. En utilisant une limite supérieure de 3 g de DHA+EPA+DPA par personne et par jour, aucun groupe de population n'a été mis en évidence comme étant trop fortement exposé, et aucun dépassement n'est donc non plus attendu pour la population européenne avec ce modèle.

L'huile RBD ne contenant pas de protéine, l'exposition aux huit protéines nouvellement exprimées, est considérée comme négligeable par le pétitionnaire.

Le pétitionnaire n'aborde pas la consommation de protéines issues du colza NS-B50027-4 en alimentation humaine. Cet aspect n'a donc pas été évalué par le GT.

<sup>3</sup> Food Standards Australia New Zealand

L'estimation de la consommation journalière maximale aux protéines nouvellement produites par le colza NS-B50027-4 pour l'animal a été réalisée en considérant des dindes nourries avec un régime comprenant jusqu'à 20 % de tourteau issu de graines de colza NS-B50027-4. Les dindes seraient exposées à un maximum de 14,3 g de tourteau par kg de poids corporel et par jour. Les apports prévus en protéines alimentaires seraient respectivement de 4,287, 9,171, 1,113, 4,778, 2,921, 20,076 et 0,896 mg par kg de poids corporel par jour pour les protéines Lackl-Δ12D, Picpa-ω3D, Micpu-Δ6D, Pavsa-Δ5D, Pyrco-Δ5E, Pavsa-Δ4D et PAT. Bien que l'apport quotidien le plus élevé ait été calculé pour la dinde, animal fort consommateur d'aliment et de protéines, les quantités de protéines nouvellement exprimées sont très faibles. L'apport estimé en protéines Lackl-Δ12D, Picpa-ω3D, Micpu-Δ6D, Pavsa-Δ5D, Pyrco-Δ5E, Pavsa-Δ4D et PAT pour le bétail et la volaille est < 0,1 % de l'apport quotidien total en protéines par kg de poids corporel dans la plupart des cas et ≤ 0,43 % dans tous les cas.

### **B.3. Caractérisation des risques**

Le pétitionnaire indique qu'il n'identifie pas de risques pour la santé animale ou pour la santé humaine.

### **B.4. Surveillance de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifié(e) consécutive à sa mise sur le marché**

Le pétitionnaire ne propose pas de plan de surveillance de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifié consécutive à sa mise sur le marché.

### **B.5. Évaluation des risques pour l'environnement (ERA)**

#### **B.5.1. Introduction**

Le pétitionnaire rappelle que la présente demande concerne l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale du colza NS-B50027-4. La culture de ce colza en Union Européenne est exclue de cette demande.

#### **B.5.2. Approche globale de l'ERA**

Le risque de dispersion dans l'environnement des graines de colza concerne principalement les ports d'importation et leurs environnements, ainsi que les voies de transports ferroviaire et routier entre ces ports et les usines de transformation (Sohn et al., 2021). Pour les espèces capables de persister dans les milieux agricoles telles que les colzas, le panel GMO de l'EFSA (EFSA, 2015) recommande de mesurer la capacité de la plante à former un stock semencier persistant et d'évaluer si cette capacité est affectée par la modification génétique via l'étude d'une série de traits. Ces informations ne sont pas suffisamment détaillées par le pétitionnaire.

**Le GT « Biotechnologie » demande la fourniture d'une analyse conforme aux recommandations du panel GMO de l'EFSA (EFSA, 2015) des conditions de germination, de dormance secondaire et de longévité des graines.**

### B.5.3. Domaines spécifiques de risque

#### B.5.3.1. Persistance et caractère envahissant y compris le « flux de gènes » de plante à plante

Le GT « Biotechnologie » note que dans l'hypothèse d'un flux de gènes depuis un colza NS-B50027-4 vers un autre colza, une ségrégation des inserts en A02 et en A05 pourrait être observée dès la première reproduction des plantes réceptrices. Le pétitionnaire ne fournit néanmoins pas d'évaluation individuelle des risques liés à l'effet de chaque insert sur le phénotype de plantes.

**Le GT « Biotechnologie » demande que la possible ségrégation des inserts en A02 et en A05 soit évaluée par le pétitionnaire.**

De plus, le pétitionnaire ne fait pas mention de la littérature existante sur la présence de populations férales de colzas (y compris génétiquement modifiées) en Europe. Les graines produites par des plantes férales qui se seraient établies suite à une dispersion accidentelle des graines de colza NS-B50027-4 pourraient être dispersées à nouveau non seulement par des animaux, mais aussi par le vent, les turbulences causées par le trafic des véhicules ou le fauchage des bords de routes. Le pétitionnaire n'envisage pas non plus la dispersion secondaire des transgènes par flux de pollen.

**Le GT « Biotechnologie » demande que le pétitionnaire prenne en compte dans son analyse l'ensemble des voies principales de dispersion des graines et du pollen.**

De la même manière, l'effet de l'évènement NS-B50027-4 sur la viabilité et le pouvoir fécondant du pollen n'a pas été évalué par le pétitionnaire, et les risques de flux de gènes espèce par espèce ne sont pas discutés (les taux d'hybridation étant très variables selon les espèces). Les deux inserts de l'évènement NS-B50027-4 étant localisés sur le génome A, les espèces les plus à risque seraient les deux espèces proches portant ce génome, *Brassica rapa* et *Brassica juncea* (deux espèces présentes en Europe).

**Le GT « Biotechnologie » demande que le risque de flux de gènes soit envisagé espèce par espèce.**

Enfin, le GT « Biotechnologie » rappelle que :

- le colza de type hiver, type principalement cultivé en Europe, est une espèce annuelle automnale (et non bisannuelle), nécessitant une période de vernalisation pour fleurir ;
- *Brassica juncea* est également cultivée en Europe, notamment pour la fabrication de moutarde ;
- des populations férales de colza sont présentes dans différents pays européens (Sohn *et al.*, 2021), ces populations étant localisées principalement le long des routes, voies ferrées et aux abords des ports commerciaux ;
- la forme sauvage de *Brassica oleracea* est présente en Europe, et notamment en France où elle est retrouvée principalement sur les côtes rocheuses calcaires de la Manche ;
- la forme sauvage de *Brassica rapa* est également présente, principalement dans le sud de la France ;
- contrairement à ce qui est mentionné par le pétitionnaire, l'usage du glufosinate-ammonium n'est plus autorisé en Europe (Commission Européenne, 2020) et la présence du gène *pat* n'est donc pas susceptible de conférer un avantage sélectif au colza NS-B50027-4.

#### B.5.3.2. Transfert de gènes de la plante à des micro-organismes

Concernant enfin le risque de transfert de gène à des micro-organismes, le pétitionnaire fournit des études bio-informatiques démontrant l'absence d'ADN inséré chez le colza NS-B50027-4 et homologue à celui de bactéries capable de permettre une recombinaison homologue. Dans le cas où une recombinaison pourrait se produire, sa stabilisation serait uniquement possible après une forte pression de sélection. Dans ce contexte, aucun avantage sélectif n'est attendu pour les micro-organismes des séquences nouvellement insérées dans le colza NS-B50027-4.

**Le GT « Biotechnologie » estime que le risque de transfert vers les micro-organismes est négligeable et non préoccupant.**

#### **B.6. Plan de surveillance des effets sur l'environnement consécutive à la mise sur le marché**

Le pétitionnaire indique que l'importation en Europe des graines de colza contenant l'évènement NS-B50027-4 n'est pas prévu. Le colza serait transformé à proximité immédiate des lieux de production, en Australie, au Canada et aux Etats-Unis. Le pétitionnaire indique que la surveillance générale sera effectuée via des contrats avec les opérateurs qui manipulent les graines. Toutefois, dans le cadre d'une autorisation de mise sur le marché, l'importation de graines en Europe doit être envisagée.

**Le GT « Biotechnologie » demande que le pétitionnaire complète la description du plan de surveillance, en précisant notamment les mesures qu'il mettrait en place dans l'Union européenne pour le colza NS-B50027-4.**

#### **B.7. Informations complémentaires sur l'innocuité de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifiés**

Le pétitionnaire a procédé à une analyse de la littérature sur la période 2009-2019, dont il détaille les modalités et les résultats dans un rapport. Il indique avoir suivi les recommandations de l'EFSA (EFSA, 2017b) pour procéder à cette revue systématique de la littérature. La formulation de la question, la recherche par mots clés, les combinaisons des termes et les opérateurs booléens sont appropriés. Le pétitionnaire a fait appel à deux « reviewers » externes pour conduire cette analyse de façon indépendante. En cas de désaccord, un troisième « reviewer » est sollicité, et la publication est également retenue si un doute subsiste.

**Le GT « Biotechnologie » considère que la limitation de la recherche bibliographique au seul colza est trop restrictive. Il demande donc que la recherche initiale prenne également en compte la modification du métabolisme lipidique dans d'autres plantes génétiquement modifiées telles que le soja pour lequel ce type de transformation génétique existe.**

### C. Conclusions du groupe de travail « Biotechnologie »

Dans la mesure où l'identité des séquences des sites d'insertion des transgènes serait confirmée entre la variété parentale AV Jade et le génome de référence Darmor et que l'analyse de l'expression des deux protéines potentiellement codées par des gènes identifiés par l'analyse bioinformatique à proximité de l'ADN-T serait réalisée, l'ensemble des éléments fournis pour la caractérisation moléculaire ne conduirait pas à mettre en évidence de risque lié à l'utilisation du colza NS-B50027-4 en alimentation humaine ou animale.

Le potentiel allergénique des huit protéines nouvellement exprimées paraît faible sur la base des critères d'évaluation retenus par l'EFSA. L'allergénicité du colza NS-B50027-4 est probablement similaire à celle d'un colza conventionnel.

Le colza NS-B50027-4 n'est pas équivalent aux variétés de référence et est différent du colza témoin AV Jade sur le plan de la composition des graines ainsi que sur les plans agronomique et phénotypique. En l'absence des données complètes d'une évaluation nutritionnelle chez une espèce cible, le GT « Biotechnologie » ne peut pas se prononcer sur la sécurité liée à la consommation du colza NS-B50027-4.

Au niveau de l'évaluation toxicologique, le GT « Biotechnologie » n'est pas en mesure de se prononcer sur la sécurité du colza NS-B50027-4. Il considère que :

- les éléments présentés sur la sécurité des sept protéines impliquées dans la synthèse du DHA devraient être complétés par les résultats d'une étude de toxicité réitérée avec la graine de colza NS-B50027-4,
- les données historiques du centre investigateur de l'étude de toxicité réitérée par gavage avec de l'huile RBD de colza NS-B50027-4 sont nécessaires pour finaliser l'expertise des données,
- les résultats d'une étude de toxicité subchronique par voie orale pendant 90 jours chez le rat répondant pleinement aux exigences du Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 devrait être réalisée avec un aliment contenant du tourteau et de l'huile ou des graines de colza NS-B50027-4.

Le GT « Biotechnologie » n'est pas en mesure d'évaluer les risques environnementaux sans :

- une analyse conforme aux recommandations du panel GMO de l'EFSA (EFSA, 2015) des conditions de germination, de dormance secondaire et de longévité des graines,
- une évaluation de la possible ségrégation dans des plantes réceptrices, des inserts en A02 et en A05 présents dans le colza NS-B50027-4,
- une prise en compte dans l'analyse de l'ensemble des voies principales de dispersion des graines et du pollen,
- une analyse espèce par espèce du risque de flux de gène.

Dans ces conditions, le « GT Biotechnologie » ne peut pas se prononcer sur la sécurité sanitaire et environnementale du colza NS-B50027-4.

Les commentaires émis par le GT « Biotechnologie » lors de la période de consultation de l'EFSA et relatifs à ces aspects sont disponibles en annexe de cet avis.

#### 4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) endosse les conclusions du GT « Biotechnologie », qui considère qu'en l'absence de certaines données déterminantes, il ne peut se prononcer sur les risques sanitaires et environnementaux relatifs à l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale du colza NS-B50027-4.

De plus, l'Agence rappelle que des lacunes des plans de surveillance environnementale concernant des colzas génétiquement modifiés autorisés ont été pointées dans l'avis de l'Anses relatif à la saisine n°2022-SA-0101 (Anses, 2023). Les conclusions et recommandations émises dans cet avis sont à prendre en compte.

Dans la mesure où des études ou données complémentaires pourraient être versées au dossier par le pétitionnaire à la demande de l'EFSA, le présent avis ne préjuge pas de conclusions finales qui pourraient être rendues ultérieurement par l'Anses au vu de ces nouvelles données.

Pr. Benoît VALLET

## MOTS-CLÉS

OGM, PGM, colza, acide gras, acide eicosapentaénoïque (EPA), acide docosahexaénoïque (DHA), glufosinate-ammonium.

*GMO, GMP, canola, fatty acid, eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), glufosinate ammonium.*

## BIBLIOGRAPHIE

Afssa. 2010. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. Maisons-Alfort : Afssa, 10 pp.

Anses. 2011a. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Recommandations pour la mise en œuvre de l'analyse statistique des données issues des études de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rat dans le cadre des demandes d'autorisation de mise sur le marché d'OGM. Maisons-Alfort : Anses, 8 p.

Anses. 2011b. Rapport d'expertise collective. Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. Maisons-Alfort : Anses, 327 p.

Anses. 2023. Avis relatif à l'évaluation des mesures de gestion faisant suite à une dissémination « accidentelle » de colza génétiquement modifié dans l'environnement. (Saisine 2022-SA-0101). Maisons-Alfort : Anses, 79 p.

Cai L., Zhou B., Guo X., Dong C., Hu X., Hou M. and Liu S. 2008. Pollen-mediated gene flow in Chinese commercial fields of glufosinate-resistant canola (*Brassica napus*). *Chinese Science Bulletin*, 53(15), 2333-2341.

Chifflet R., Klein E.K., Lavigne C., Le Féon V., Ricroch A.E., Lecomte J. and Vaissière B.E. 2011. Spatial scale of insect-mediated pollen dispersal in oilseed rape in an open agricultural landscape. *Journal of Applied Ecology*, 48, 689-696.

Colgrave M. L., Byrne K., Vibhakaran Pillai S., Dong B., Leonforte A., Caine J., Kowalczyk L., Scoble J. A., Petrie J. R., Singh S. and Zhou X.-R. 2019a. Quantitation of seven transmembrane proteins from the DHA biosynthesis pathway in genetically engineered canola by targeted mass spectrometry. *Food and Chemical Toxicology* 126, 313-321.

Colgrave M. L., Byrne K., Caine J., Kowalczyk L., Vibhakaran Pillai S., Dong B., Lovrecz G., MacIntosh S., Scoble J. A., Petrie J. R., Singh S. and Zhou X.-R. 2019b. Proteomics reveals the *in vitro* protein digestibility of seven transmembrane enzymes from the docosahexaenoic acid biosynthesis pathway. *Food and Chemical Toxicology* 130, 89-98.

Commission Européenne. 2013. Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 de la Commission du 3 avril 2013 relatif aux demandes d'autorisation de denrées alimentaires et d'aliments pour animaux génétiquement modifiés introduites en application du règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements de la Commission (CE) n° 641/2004 et (CE) n° 1981/2006. OJ L 157, 8.6.2013, 1-48.

Commission Européenne. 2020. Règlement délégué (UE) 2020/1068 de la Commission du 15 mai 2020 modifiant les annexes I et V du règlement (UE) no 649/2012 du Parlement européen et du Conseil concernant les exportations et importations de produits chimiques dangereux. OJ L 234, 21.7.2020, 1-7.

EFSA (European Food Safety Authority). 2010a. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 8, 1879, 111 pp.

EFSA (European Food Safety Authority). 2010b. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Scientific opinion on Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs. *EFSA Journal*, 8, 1250, 59 pp.

EFSA (European Food Safety Authority). 2010c. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA); Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*, 8, 1461, 107 pp.

EFSA (European Food Safety Authority). 2012. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA). *EFSA Journal*, 10, 2815, 48 pp.

EFSA (European Food Safety Authority). 2014. Explanatory statement for the applicability of the Guidance of the EFSA Scientific Committee on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed for GMO risk assessment. *EFSA Journal*, 12, 3871, 25 pp.

EFSA (European Food Safety Authority). 2015. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Guidance on the agronomic and phenotypic characterisation of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 13, 4128, 44 pp.

EFSA (European Food Safety Authority). 2017a. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) Guidance on allergenicity assessment of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 15, 4862, 49 pp.

EFSA (European Food Safety Authority). Devos Y., Guajardo I. M., Glanville J. and Waigmann E. 2017b. Explanatory note on literature searching conducted in the context of GMO applications for (renewed) market authorisation and annual post-market environmental monitoring reports on GMOs authorised in the EU market. *EFSA supporting publications*, 1207. 48 pp.

FSANZ (Food Standards Australia New Zealand). 2017. Supporting Document 2. Nutrition Risk Assessment Report (at Approval) – Application A1143. Food derived from DHA canola line NS-B5ØØ27-4, 22 pp.

Hérouet C., Esdaile D. J., Mallyon B. A., Debryne E., Schultz A., Currier T., Hendrickx K., Van der Klis R.-J., Rouan D. 2005. "Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 41, 134-149.

NF X50-110:2003 Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).

OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). 1998. Guideline for the Testing of Chemicals, "Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents" (Updated Guideline 408, adopted September 21, 1998)

OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). 2011. Revised Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Low Erucic Acid Rapeseed (Canola) Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Toxicants. No. 24. Organisation for Economic Co-operation and Development. Paris, 38 pp.

Pessel F.D., Lecomte J., Emeriau V., Krouti M., Messean A., Gouyon P.H. 2001. Persistence of oilseed rape (*Brassica napus* L.) outside of cultivated fields. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 841–846.

Petrie J. R., Shrestha P., Zhou X. R., Mansour M. P., Liu Q., Belide S., Nichols P. D. and Singh S.P. 2012. Metabolic Engineering plant seeds with fish oil-like levels of DHA. *PLoS One*, 7, e49165.

Petrie J. R., Shrestha P., Belide S., Kennedy Y., Lester G., Liu Q., Divi U. K., Mulder R. J., Mansour M. P., Nichols P. D. and Singh S. P. 2014. Metabolic engineering *Camelina sativa* with fish oil-like levels of DHA. *PLoS One*, 9, e85061.

Règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés. *OJ L* 268, 18.10.2003, 1-23.

Règlement (CE) N° 396/2005 du Parlement européen et du Conseil du 23 février 2005 concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et animale et modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE. *OJ L* 70, 16.3.2005, 1-16.

Règlement (UE) 2015/2283 du Parlement européen et du Conseil du 25 novembre 2015 relatif aux nouveaux aliments, modifiant le règlement (UE) n°1169/2011 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant le règlement (CE) n°258/97 du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) n°1852/2001 de la Commission. *OJ L* 327, 11.12.2015, 1-22.

Rieger M. A., Potter T. D., Preston C. and Powles S. B. 2001. Hybridisation between *Brassica napus* L. and *Raphanus raphanistrum* L. under agronomic field conditions. *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 555–560.

Ruiz-Lopez N., Haslam R. P., Napier J. A., and Sayanova O. 2014. Successful high-level accumulation of fish oil omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in a transgenic oilseed crop. *Plant Journal*, 77, 198–208.

Ruyter B., Sissener N. H., Østbye T.-K., Simon C. J., Krasnov A., Bou M., Sanden M., Nichols P. D., Lutfi E. and Berge G. M. 2019. n-3 Canola oil effectively replaces fish oil as a new safe dietary source of DHA in feed for juvenile Atlantic salmon. *British Journal of Nutrition*, 122, 1329-1345.

Sohn S.-I., Pandian S., Oh, Y.-J., Kang H.-J., Ryu T.-H., Cho W.-S., Shin E.-K., Shin, K.-S. 2021. A Review of the Unintentional Release of Feral Genetically Modified Rapeseed into the Environment. *Biology*, 10, 1264.

Zhou J., Loh Y-T., Bressan R. A., Martin G. B. 1995. The Tomato Gene *Phil* Encodes a Serine/Threonine Kinase That Is Phosphorylated by Pto and Is Involved in the Hypersensitive Response. *Cell*, 83, 925-935.

## CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2023). Avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003, du colza génétiquement modifié NS-B50027-4 développé pour avoir un profil modifié en acides gras et pour être tolérant au glufosinate-ammonium, pour l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2019-160). (saisine n° 2022-SA-0096). Maisons-Alfort : Anses, 39 p.

ANNEXE 1

## Commentaires de l'Anses à destination de la DGCCRF pour transmission à l'EFSA

concernant la demande d'avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003, du colza génétiquement modifié NS-B50027-4 développé pour avoir un profil modifié en acides gras et pour être tolérant au glufosinate-ammonium pour l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM

Dossier n° EFSA-NL-2019-160

### A. Informations générales

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du groupe de travail (GT) « Biotechnologie » de l'Anses.

### B. Informations scientifiques

#### 1. Identification et caractérisation des dangers

##### 1.1. Informations concernant les plantes réceptrices ou (le cas échéant) parentales

Le pétitionnaire présente les différentes voies naturelles de dissémination du pollen de colza. Il indique notamment, mais sans citer de référence, que le vent peut engendrer une dispersion du pollen jusqu'à 1,5 km de la plante « mère ». Des études de terrain ont néanmoins montré que le flux de pollen entre les champs cultivés se produit jusqu'à des distances de 2 à 3 km (Cai *et al.*, 2008) (Rieger *et al.*, 2002). Le pétitionnaire indique également que les études de dispersion du pollen permettent seulement une évaluation du potentiel de croisement avec une autre plante et non des croisements effectifs (*"It must be noted that experiments measuring pollen movements using e.g. bait plants, only give an indication of potential for outcrossing, not the outcrossing actually occurring."*). Les études précédemment citées ont cependant bien mesuré le flux de pollen efficace, en utilisant des résistances aux herbicides comme marqueurs génétiques du flux de gènes.

De la même manière, la littérature scientifique concernant le transport du pollen par l'intermédiaire des insectes est insuffisamment citée. Or, il a été démontré qu'une grande diversité d'insectes sont capables de disperser le pollen de colza et que du pollen fécondant peut être déposé par les abeilles de grande taille à plus de 1000 mètres du plant d'origine (Chifflet *et al.*, 2011).

La littérature concernant les populations férales de colza est aussi insuffisamment citée. La référence citée par le pétitionnaire (Devos *et al.*, 2012) considère les populations férales comme étant transitoires, mais d'autres études ont montré leur capacité à se maintenir à long terme, parfois jusqu'à 8 ans (Pessel *et al.*, 2001).

Bien que l'autorisation de la culture du colza NS-B50027-4 ne soit pas demandée par le pétitionnaire, **le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande qu'une meilleure prise en compte soit faite par le pétitionnaire de la littérature concernant la biologie de l'espèce, notamment la biologie de la reproduction, la survie et la dispersion, afin d'évaluer les conséquences possibles d'une dissémination accidentelle de graines de colza NS-B50027-4. Les points à considérer sont la capacité à s'établir et passer l'hiver, la capacité à se reproduire et se croiser avec des plantes compatibles, et la capacité à former des populations férales (EFSA, 2010b).**

## 1.2. Caractérisation moléculaire

### 1.2.1. Informations concernant la modification génétique

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

### 1.2.2. Informations concernant la plante génétiquement modifiée

L'insertion dans le colza NS-B50027-4 d'ADN exogène issu du vecteur binaire pJP3416\_GA7-ModB a été caractérisée par séquençage et comparaison de séquences avec le génome de référence de *Brassica napus*, variété Darmor. Les résultats montrent la présence de séquences d'ADN-T en deux sites distincts, sur les chromosomes A02 et A05. L'insert présent dans le chromosome A02 comporte seulement un ADN-T partiel avec quatre des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras, tandis que l'insert présent dans le chromosome A05 correspond à une double insertion de l'ADN-T complet, en orientation inversée.

L'analyse du site d'insertion dans le chromosome A02 révèle une délétion de 15 pb du génome de colza, dans la région 3'UTR de l'ORF (*open reading frame*, cadre ouvert de lecture) putatif du gène *hpp* codant une protéine de fonction inconnue, et l'analyse du site d'insertion dans le chromosome A05 révèle une délétion de 20 pb du génome de colza, dans le deuxième exon de l'ORF putatif du gène *pti* codant une protéine de fonction inconnue chez le colza, impliquée chez d'autres plantes dans le mécanisme de réponse hypersensible en réaction à l'agression par un agent pathogène.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses considère que l'absence de séquençage des deux sites d'insertion dans la variété de colza AV Jade (variété utilisée pour la transformation génétique) ne permet pas de confirmer la délétion au niveau des deux sites d'insertion et les interruptions des deux gènes potentiels dans cette variété de colza. De plus, le GT considère qu'il serait plus pertinent de comparer les données de séquençage du colza NS-B50027-4 avec les séquences correspondantes du colza de la variété AV Jade, variété parentale utilisée pour la transformation, afin de confirmer la présence des gènes *hpp* et *pti*, et les délétions dans le génome du colza parental.

**Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire vérifie également l'expression des gènes *hpp* et *pti* dans le colza AV Jade et démontre que leurs niveaux d'expression dans différents tissus végétaux ne sont pas modifiés par la transformation génétique dans le colza NS-B50027-4.**

### 1.2.3 Informations complémentaires concernant la plante génétiquement modifiée vis-à-vis des aspects de sécurité environnementale

Autres informations (par exemple informations complémentaires sur les événements simples ou les sous-combinaisons dans le cadre des dossiers sur des PGM à événements empilés)

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

## 1.3. Evaluation comparative

1.3.1. Choix et description des matériels testés y compris l'arbre de sélection de la lignée génétiquement modifiée, conditions de production des graines, tests de germination des graines, information sur les variétés de référence

Dans le cadre de l'évaluation comparative, les lots de graines du colza NS-B50027-4 ont été produits dans l'état de Washington (États-Unis) en 2019, tandis que les lots de graines du témoin isogénique de variété AV Jade ont été produits dans la Lockyer Valley (Australie) en 2018. Pour rappel, l'EFSA (EFSA, 2015) recommande l'utilisation de matériels génétiques produits dans des conditions environnementales similaires (*"To guarantee the reliability of the agronomic and phenotypic dataset, the use of high-quality test materials produced under similar environmental and management conditions is required"*).

**Le GT « Biotechnologie de l'Anses demande que le pétitionnaire détaille davantage ces deux lieux de production et leurs conditions pédoclimatiques afin de démontrer que les conditions de production différentes des graines n'ont pas d'incidence sur les analyses comparatives agronomiques et phénotypiques ou sur les analyses comparatives de composition.**

1.3.2. Dispositif expérimental et analyse statistique des données issues des essais au champ pour l'analyse comparative

Le pétitionnaire précise que les variétés NS-B50027-4, AV Jade et les variétés de référence sont des variétés de printemps. La précocité et la durée du cycle des plantes sont des paramètres importants afin d'évaluer la capacité de reproduction de plantes férales qui seraient issues de dispersion non-intentionnelle des graines.

**En conséquence, le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que la précocité et la durée du cycle des plantes soient mesurées en degrés-jours et non en nombre de jours, pour pouvoir être transposées aux conditions européennes. De plus, le GT demande que les différents programmes informatiques d'analyse statistique soient fournis conformément au document guide de l'EFSA (EFSA, 2010a).**

1.3.3. Sélection du matériel et des composés pour analyse

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses note que les analyses de composition respectent les lignes directrices de l'OCDE pour le colza (OECD, 2011) à l'exception de l'analyse des acides gras de C6 à C12. Les lignes directrices de l'OCDE recommandent en cas d'utilisation en alimentation humaine une analyse de C6 à C24 et le pétitionnaire présente uniquement une analyse des données pour les acides gras de C14 à C24.

**Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire fournisse les données de l'analyse comparative pour les teneurs en acides gras de C6 à C12, ou justifie leurs absences.**

1.3.4. Analyse comparative de la composition

L'analyse comparative des graines de colza de référence et de colza témoin isogénique AV Jade avec des graines de colza NS-B50027-4 traité ou non traité au glufosinate-ammonium révèle respectivement 18 et 13 composés classés en types 5, 6 ou 7 tels que définis par l'EFSA (EFSA, 2010a). Le pétitionnaire considère que les non-équivalences et les différences de composition des graines de colza NS-B50027-4 sont faibles et biologiquement non significatives, la moyenne obtenue pour la plante génétiquement modifiée étant comprise entre les valeurs minimales et maximales des variétés commerciales.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses considère que ces arguments sont insuffisants pour démontrer que, en dehors des différences attendues de teneurs en acides gras, les différences de composition observées sont biologiquement non significatives.

**Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande donc que, en dehors des différences attendues pour les teneurs en acides gras, les différences et les non-équivalences observées (types 5 à 7)**

**entre les graines de colza NS-B50027-4 et les graines de colza témoin et de référence soient analysées et discutées sur le plan biologique.**

#### 1.3.5. Analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques

Comme pour l'analyse de composition des graines, l'analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques des plantes de colza NS-B50027-4 traité ou non traité au glufosinate-ammonium révèle 6 paramètres agronomiques et phénotypiques classés en types 6 ou 7 tels que définis par l'EFSA (EFSA, 2010a). Le pétitionnaire considère que les non-équivalences et les différences identifiées sont biologiquement non significatives, la moyenne obtenue pour la plante génétiquement modifiée étant comprise entre les valeurs minimales et maximales des variétés commerciales. De plus, bien que les différences observées ne soient pas toujours significatives dans les tests statistiques effectués site par site, un même sens de variation est systématiquement observé. Le GT « Biotechnologie » de l'Anses considère que ces arguments sont insuffisants pour démontrer que les différences observées sont biologiquement non significatives.

**Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande donc que les différences et les non-équivalences observées (types 6 et 7) entre le colza NS-B50027-4 et les colzas témoin et de référence soient analysées et discutées sur le plan biologique.**

#### 1.3.6. Effets de la transformation

Le pétitionnaire s'appuie sur une étude réalisée en 2015 à partir de graines de colza NS-B50027-4 non traité au glufosinate-ammonium et de colza témoin isogénique de la variété AV Jade cultivées en Australie pour analyser et comparer la composition de deux types de tourteaux [tourteaux obtenus par pression (« tourteaux gras ») et tourteaux extraits à l'hexane] et de trois types d'huile [huile brute, huile extraite à l'hexane et huile raffinée, blanchie et désodorisée (huile RBD)]. Les analyses sont réalisées selon les lignes directrices de l'OCDE (OECD, 2011).

**Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire présente, pour les tourteaux et pour les huiles, les sommes des teneurs en acides gras polyinsaturés n-3 et n-6, et le rapport de ces sommes.**

**Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande également que le dossier soit complété avec :**

- **les données de composition des graines de colza des deux variétés de colza utilisées pour préparer les produits alimentaires ;**
- **des commentaires du pétitionnaire sur le devenir des différents composés présents initialement dans les graines et leur répartition dans les tourteaux et les huiles ;**
- **des argumentations sur les phénomènes d'oxydation ou d'hydrogénation potentiels des acides gras polyinsaturés dans les tourteaux gras et les huiles issus de colza NS-B50027-4 en raison de la composition en acides gras modifiée suite à la transformation génétique. Les précautions d'emploi et de conservation de ces produits alimentaires devraient être renseignées en raison de l'instabilité éventuelle des acides gras polyinsaturés.**

En dehors de la présence vraisemblable des huit protéines nouvellement exprimées dans les graines de colza NS-B50027-4, le GT « Biotechnologie » de l'Anses considère que la composition des tourteaux extraits à l'hexane est similaire à celle de ce même type de tourteaux produits avec la variété de colza AV Jade. Par contre, pour les tourteaux obtenus par pression (« tourteaux gras »), la proportion de glucides et de lipides est différente entre les tourteaux obtenus à partir de graines de colza NS-B50027-4 ou de graines de colza témoin isogénique de la variété AV Jade.

**Pour les tourteaux obtenus par pression (« tourteaux gras »), le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire indique si les différences de composition observées sont dues à une différence d'efficacité du procédé d'extraction entre les tourteaux issus des graines des deux variétés ou d'une différence de composition liée à la variété de colza.**

L'analyse comparative des huiles obtenues à partir de graines de colza NS-B50027-4 ou de graines de colza témoin isogénique de la variété AV Jade confirme les différences de composition en acides gras

attendues en raison de la transformation génétique. Toutefois, la teneur des acides gras *trans* totaux dans l'huile RBD issue de graines de colza NS-B50027-4 est supérieure à celle observée pour l'huile issue des graines de colza de la variété AV Jade.

**Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que la différence de teneur des acides gras *trans* totaux dans l'huile RBD issue de graines de colza NS-B50027-4 soit discutée et que les sommes des teneurs en acides gras polyinsaturés n-3 et n-6 et le rapport de ces sommes soient présentés et discutés.**

#### 1.3.7 Conclusions de l'évaluation comparative

Le pétitionnaire conclut que le colza NS-B50027-4 est équivalent au colza témoin AV Jade et aux variétés de référence à l'exception des modifications du profil en acides gras en accord avec la transformation génétique. Il en déduit qu'aucune étude supplémentaire n'est nécessaire. Cependant, le GT « Biotechnologie » de l'Anses considère que le colza NS-B50027-4 n'est pas équivalent aux variétés de référence et est différent du colza témoin AV Jade sur le plan de la composition des graines et sur le plan agronomique et phénotypique.

**Le GT « Biotechnologie » de l'Anses considère qu'une évaluation nutritionnelle chez une espèce cible est en conséquence nécessaire pour renseigner la sécurité liée à la consommation du colza NS-B50027-4. Les argumentations complémentaires demandées ci-dessus doivent aussi être apportées.**

### 1.4. Toxicologie

#### 1.4.1. Analyse des protéines nouvellement exprimées

Le pétitionnaire présente une argumentation détaillée pour documenter la sécurité des huit protéines nouvellement exprimées dans le colza NS-B50027-4. Il informe ne pas pouvoir réaliser d'études de toxicité orale à doses répétées pendant 28 jours chez le rongeur puisque la synthèse et la purification des protéines nouvellement exprimées dans le colza NS-B50027-4 sous forme fonctionnelle dans des systèmes cellulaires est complexe et que le niveau d'expression de ces protéines dans le colza NS-B50027-4 est trop faible pour pouvoir en purifier suffisamment.

**Le GT « Biotechnologie » considère qu'il serait pertinent de réaliser une étude de toxicité par administration orale répétée pendant 28 jours chez le rongeur avec la graine de colza NS-B50027-4 *a minima*, en remplacement d'une étude de toxicité sur des protéines purifiées. Elle permettrait de pallier les difficultés de production individuelle des huit protéines nouvellement exprimées dans le colza, et également d'évaluer les effets de leurs interactions potentielles.**

#### 1.4.2. Analyse des nouveaux constituants autres que les protéines

Le pétitionnaire a réalisé une évaluation de l'innocuité d'une huile RBD produite à partir de graines de colza NS-B50027-4 par administration orale à doses répétées pendant 28 jours chez le rat. Les groupes témoins recevaient soit un régime sans huile, soit de l'huile de maïs, soit de l'huile RBD produite à partir de graines de colza témoin AV Jade. Le pétitionnaire fournit les données individuelles de cette étude mais ne fournit pas les données historiques du centre investigateur pour la même espèce animale et les dates qui couvrent l'étude. Des différences biologiques statistiquement significatives sont observées. Leur imputabilité à la consommation d'huile RBD issue de colza NS-B50027-4 ne peut être écartée faute de pouvoir finaliser l'expertise.

**Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande donc que les données historiques du centre investigateur soient fournies par le pétitionnaire pour pouvoir finaliser son expertise.**

#### 1.4.3 Informations sur les constituants modifiés des denrées alimentaires et des aliments pour animaux

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

#### 1.4.4. Analyse de l'aliment (denrée alimentaire ou aliment pour animaux) génétiquement modifié entier

Le pétitionnaire présente les résultats d'une étude de toxicité subchronique menée pendant 13 semaines chez le rat, testant séparément des régimes contenant de l'huile RBD ou des tourteaux issus de graines de colza NS-B50027-4.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses ne peut pas se prononcer sur la sécurité du colza NS-B50027-4 sur la base de cette étude de toxicité subchronique en raison de :

- l'absence d'information sur le traitement au glufosinate-ammonium des plantes de colza NS-B50027-4 cultivées pour la production des graines ;
- l'absence des bulletins d'analyse permettant de vérifier l'équivalence nutritionnelle des aliments distribués ;
- l'absence de recherche de l'ensemble des mycotoxines réglementées en dehors des aflatoxines B1, B2, G1, G2 ;
- la mise en œuvre d'une seule dose dans les régimes distribués (20 % d'huile ou 20 % de tourteau de colza) et la non-justification du choix de ces doses, le Règlement d'exécution (UE) n°503/2013, en vigueur pour ce dossier, en requérant deux (« *Il y a lieu d'utiliser, en principe, au moins deux doses d'essai et un échantillon de contrôle négatif. La dose la plus élevée doit être la dose maximale qu'il est possible d'atteindre sans entraîner de déséquilibre nutritionnel ; la dose la plus faible doit toujours contenir une quantité de la denrée alimentaire et/ou de l'aliment pour animaux étudiés supérieure à l'apport attendu chez l'Homme ou l'animal cible. L'aliment (denrée alimentaire ou aliment pour animaux) génétiquement modifié analysé doit être en rapport avec le produit destiné à être consommé.* ») ;
- le faible nombre de rats par groupe (10 rats par sexe) - l'Anses (Anses, 2011) préconisant un nombre de 20 mâles et 20 femelles par groupe ;
- l'absence de calcul de puissance et la non-présentation des programmes statistiques utilisés ;
- l'absence des données historiques du centre investigateur qui ne permet pas d'appréhender les variations des paramètres observés.

**Le GT « Biotechnologie » de l'Anses considère qu'une étude de toxicité subchronique par voie orale pendant 90 jours chez le rat répondant pleinement aux exigences du Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013, réalisée avec des aliments contenant simultanément des tourteaux et une part d'huile, ou des graines de colza NS-B50027-4, est nécessaire pour documenter la sécurité alimentaire pour l'Homme et l'animal, et demande donc qu'une telle étude soit réalisée par le pétitionnaire.**

#### 1.5. Evaluation de l'allergénicité

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

## 1.6. Evaluation nutritionnelle

### 1.6.1. Évaluation nutritionnelle des denrées alimentaires génétiquement modifiées

Les acides gras n-3 présents dans l'huile de colza NS-B50027-4 sont majoritairement le C18:3 n-3 (acide alpha-linolénique, ALA) et le C22:6 n-3 (acide docosapentaénoïque, DHA). La comparaison de profils en acides gras n-3 entre l'huile de colza NS-B50027-4 et différentes huiles contenant des acides gras n-3 (lin, poissons, crustacés et microalgues) ne met pas en évidence de profil similaire. Une réflexion pourrait être menée pour savoir si cette huile est équivalente à d'autres denrées alimentaires consommées en Europe ou est à considérer en tant que potentiel nouvel aliment au titre du Règlement (UE) 2015/2283.

### 1.6.2. Évaluation nutritionnelle des aliments pour animaux génétiquement modifiés

Le colza NS-B50027-4 étant différent de son témoin isogénique AV Jade et non-équivalent aux variétés commerciales, une évaluation nutritionnelle chez une espèce cible est nécessaire pour renseigner la sécurité du colza NS-B50027-4. Le pétitionnaire fournit un article scientifique (Ruyter *et al.*, 2019) présentant une étude nutritionnelle sur le saumon réalisée en Australie et en Norvège. Dans le cas présent, le saumon peut être considéré comme une espèce cible adaptée. Les résultats présentés sous la forme d'un article scientifique ne sont pas recevables en l'absence des données brutes et des analyses statistiques détaillées.

**Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire fournisse les données brutes de l'étude nutritionnelle, et justifie le choix d'analyses statistiques variables en fonction du site d'étude.**

## 2. Évaluation de l'exposition - Prévission de la quantité consommée ou de l'étendue de l'utilisation

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

## 3. Caractérisation des risques

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

## 4. Surveillance de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifié(e) consécutive à sa mise sur le marché

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

## 5. Evaluation des risques pour l'environnement (ERA)

### 5.1. Introduction

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

### 5.2. Approche globale de l'ERA

Pour les espèces capables de persister dans les milieux agricoles telles que les colzas, l'EFSA (EFSA, 2015) recommande de mesurer la capacité de la plante à former un stock semencier persistant et d'évaluer si cette capacité est affectée par la modification génétique via l'étude d'une série de traits, non caractérisés par le pétitionnaire. Les lipides de réserves ont un rôle clé dans la maturation, la germination et la longévité des graines de colza.

**Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande qu'une analyse conforme aux recommandations de l'EFSA (EFSA, 2015) des conditions de germination, de dormance secondaire et de longévité des graines soit fournie par le pétitionnaire.**

### **5.3. Domaines spécifiques de risque**

#### **5.3.1. Persistance et caractère envahissant y compris le « flux de gènes » de plante à plante**

Dans l'hypothèse d'un flux de gènes depuis un colza NS-B50027-4 vers un autre colza, une ségrégation des inserts A02 et A05 pourra être observée dès la première reproduction des plantes réceptrices. Le pétitionnaire ne fournit néanmoins pas d'évaluation individuelle des risques liés à l'effet de chaque insert sur le phénotype de plantes.

**Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que la possible ségrégation des inserts A02 et A05 soit évaluée par le pétitionnaire.**

De plus, le pétitionnaire ne fait pas mention de la littérature existante sur la présence de populations férales de colzas (y compris génétiquement modifiés) en Europe. Les graines produites par des plantes férales qui se seraient établies suite à une dispersion accidentelle des graines de colza NS-B50027-4 pourraient être dispersées à nouveau non seulement par des animaux, mais aussi par le vent, les turbulences causées par le trafic des véhicules ou le fauchage des bords de routes. Le pétitionnaire n'envisage pas non plus la dispersion secondaire des transgènes par flux de pollen.

**Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande donc que le pétitionnaire prenne en compte dans son analyse l'ensemble des voies principales de dispersion des graines et du pollen.**

De la même manière, l'effet de l'évènement NS-B50027-4 sur la viabilité et le pouvoir fécondant du pollen n'a pas été évalué par le pétitionnaire, et les risques de flux de gènes espèce par espèce ne sont pas discutés (les taux d'hybridation étant très variables selon les espèces). Les deux inserts de l'évènement NS-B50027-4 étant localisés sur le génome A, les espèces les plus à risque seraient les deux espèces proches portant ce génome, *Brassica rapa* et *Brassica juncea* (deux espèces présentes en Europe).

**Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande donc que le risque de flux de gènes soit détaillé espèce par espèce.**

Enfin, le GT « Biotechnologie » de l'Anses rappelle que :

- le colza de type hiver est une espèce annuelle automnale (et non bisannuelle), nécessitant une période de vernalisation pour fleurir ;
- *Brassica juncea* est également cultivée en Europe, notamment pour la fabrication de moutarde ;
- des populations férales de colza sont présentes dans différents pays européens (Sohn *et al.*, 2021), ces populations étant localisées principalement le long des routes, voies ferrées et aux abords des ports commerciaux ;
- la forme sauvage de *Brassica oleracea* est présente en Europe, et notamment en France où elle est retrouvée principalement sur les côtes rocheuses calcaires de la Manche ;
- la forme sauvage de *Brassica rapa* est également présente, principalement dans le sud de la France ;
- contrairement à ce qui est mentionné par le pétitionnaire, l'usage du glufosinate-ammonium n'est plus autorisé en Europe (Commission Européenne, 2020) et la présence du gène *pat* n'est donc pas susceptible de conférer un avantage sélectif au colza NS-B50027-4.

5.3.2. à 5.3.8.

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

## 6. Plan de surveillance des effets sur l'environnement

### 6.1. et 6.2.

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

### 6.3. Surveillance générale (stratégie, méthode)

Le pétitionnaire indique que l'import en Europe des graines de colza contenant l'évènement NS-B50027-4 n'est pas prévu. Le colza serait transformé à proximité immédiate des lieux de production, en Australie, au Canada et aux Etats-Unis. Le pétitionnaire indique que la surveillance générale sera effectuée via des contrats avec les opérateurs qui manipulent les graines. Toutefois, dans le cadre d'une autorisation de mise sur le marché, l'importation de graines en Europe ne peut être exclue.

**Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire complète la description du plan de surveillance, en précisant notamment les mesures mises en place dans l'Union Européenne pour le colza NS-B50027-4.**

### 6.4. Résultats signalés du PMEM

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

## 7. Informations complémentaires sur l'innocuité de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifiés

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses considère que la limitation de la recherche bibliographique au seul colza est trop restrictive, **et demande donc que la recherche initiale prenne également en compte la modification du métabolisme lipidique dans d'autres plantes génétiquement modifiées telles que le soja.**

## Références

Anses. 2011. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Recommandations pour la mise en œuvre de l'analyse statistique des données issues des études de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rat dans le cadre des demandes d'autorisation de mise sur le marché d'OGM. Maisons-Alfort : Anses, 8 p.

Cai, L., Zhou, B., Guo, X., Dong, C., Hu, X., Hou, M. and Liu, S. 2008. Pollen-mediated gene flow in Chinese commercial fields of glufosinate-resistant canola (*Brassica napus*). *Chinese Science Bulletin*, 53(15), 2333-2341.

Chifflet, R., Klein, E.K., Lavigne, C., Le Féon, V., Ricoch, A.E., J., L., and Vaissière, B.E. 2011. Spatial scale of insect-mediated pollen dispersal in oilseed rape in an open agricultural landscape. *J. Appl. Ecol.*, 48, 689-696.

Commission Européenne. 2020. Règlement délégué (UE) 2020/1068 de la Commission du 15 mai 2020 modifiant les annexes I et V du règlement (UE) no 649/2012 du Parlement européen et du Conseil concernant les exportations et importations de produits chimiques dangereux. *OJ L 234*, 21.7.2020, 1–7.

Devos Y, Hails RS, Messéan A, Perry JN and Squire GR. 2012. Feral genetically modified herbicide tolerant oilseed rape from seed import spills: are concerns scientifically justified? *Transgenic Research*, 21, 1–21.

EFSA (European Food Safety Authority). 2010a. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Scientific opinion on Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs. *EFSA Journal*, 8, 1250, 59 pp. doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1250.

EFSA (European Food Safety Authority). 2010b. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 8, 1879, 111 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2010.1879.

EFSA (European Food Safety Authority). 2015. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Guidance on the agronomic and phenotypic characterisation of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 13, 4128, 44 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4128.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2011. Revised Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Low Erucic Acid Rapeseed (Canola) Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Toxicants. No. 24. Organisation for Economic Co-operation and Development. Paris, 38 pp.

Pessel, F.D.; Lecomte, J.; Emeriau, V.; Krouti, M.; Messean, A.; Gouyon, P.H. 2001. Persistence of oilseed rape (*Brassica napus* L.) outside of cultivated fields. *Theor. Appl. Genet.*, 102, 841–846.

Rieger, M. A., Potter, T. D., Preston, C. and Powles S. B. 2001. Hybridisation between *Brassica napus* L. and *Raphanus raphanistrum* L. under agronomic field conditions. *Theor. Appl. Genet.*, 103, 555–560.

Ruyter B, Sissener NH, Østbye T-K, Simon CJ, Krasnov A, Bou M, Sanden M, Nichols PD, Lutfi E and Berge GM. 2019. n-3 Canola oil effectively replaces fish oil as a new safe dietary source of DHA in feed for juvenile Atlantic salmon. *British Journal of Nutrition*, 122, 1329-1345.

Sohn, S.-I.; Pandian, S.; Oh, Y.-J.; Kang, H.-J.; Ryu, T.-H.; Cho, W.-S.; Shin, E.-K.; Shin, K.-S. 2021. A Review of the Unintentional Release of Feral Genetically Modified Rapeseed into the Environment. *Biology*, 10, 1264. <https://doi.org/10.3390/biology10121264>.