

HAUT CONSEIL DES BIOTECHNOLOGIES

COMITE SCIENTIFIQUE

Paris, le 14 octobre 2010

AVIS

en réponse à la saisine¹ **091201-saisine HCB-info compl oeillets**
concernant notamment le dossier **C/NL/97/13-01**.

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 5 décembre 2009 par les autorités compétentes françaises (le Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche) d'une demande d'avis relative à une évaluation du dossier C/NL/97/13-01 de demande de renouvellement d'autorisation d'importation d'œillets sous forme de fleurs coupées à des fins ornementales.

Ce dossier a été déposé par la société Florigene Pty Limited dans le cadre de la directive 2001/18/CE auprès des autorités compétentes hollandaises, sous le référence **C/NL/97/13-01**. La saisine du HCB correspondante est référencée **091221-saisine HCB-info compl oeillets**.

Le Comité scientifique (CS)² du HCB a procédé à l'examen du dossier le 3 septembre 2010 sous la présidence de Jean-Christophe Pagès.

¹ La saisine « **091221-saisine HCB-info compl oeillets** » est reproduite dans l'Annexe 1.

² La composition du CS ainsi que le rapporteur externe ayant contribué à l'élaboration de l'avis sont indiqués dans l'Annexe 2.

RESUME DE L'AVIS³

La saisine reçue par le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) porte sur l'évaluation du dossier C/NL/97/13-01, Ce dossier déposé par la société Florigene C/NL/97/13-01 correspond à une demande de renouvellement d'autorisation d'importation de la lignée 1363-A dont le nom commercial est MoonshadowTM.

Description du produit

La lignée 1363-A résulte de l'intégration d'une construction génétique contenant trois cassettes d'expression dont deux incluent des gènes impliqués dans la régulation de la synthèse des anthocyanes dans le but de conférer aux fleurs une couleur pourpre-violette. La quatrième cassette code une acétolactase synthétase (ALS) mutante de tabac (*Nicotiana tabacum*), conférant une résistance aux herbicides de la famille des sulfonylurées, exploitée uniquement pour la sélection des transformants primaires après transformation.

La construction génétique s'est intégrée dans trois loci différents. Devant des incohérences de description moléculaire dans le dossier du pétitionnaire, le CS a procédé à une nouvelle analyse de ces loci, « manuellement », les données n'étant pas fournies sous une forme analysable par des outils bioinformatiques. Cette analyse a mis en évidence de profonds remaniements de la construction à chaque locus, présentés dans le rapport.

Impact sur la santé humaine et animale

La demande concerne un usage exclusivement ornemental, les œillets ne sont pas destinés à l'alimentation humaine et animale. Dans l'hypothèse d'une consommation fortuite, le pétitionnaire a analysé la toxicité ainsi que le potentiel allergénique de la lignée 1363-A.

Les œillets ne sont pas connus pour être toxiques ou allergéniques. Un test de génotoxicité sur bactéries n'a pas détecté d'effet mutagène de la lignée d'œillet génétiquement modifiée 1363-A ou de la delphinidine isolée. Un test de toxicité aiguë n'a pas mis en évidence de létalité ou de différences macroscopiques induites par la consommation d'œillets transgéniques de la lignée 1363-A. Les protéines codées par les transgènes, et le pigment de delphinidine résultant de leur expression, sont par ailleurs naturellement présents dans d'autres fleurs, et dans des fruits comestibles. L'analyse bioinformatique des peptides potentiellement produits par de nouveaux ORF⁴ créés dans la lignée génétiquement modifiée a identifié des motifs de six acides aminés également présents dans des protéines connues pour être toxiques ou allergéniques. Aucune analyse complémentaire n'ayant été effectuée par le pétitionnaire, la production de ces protéines, et a fortiori leur potentiel toxique ou allergénique restent hypothétiques. Les données sont toutefois fournies sous une forme ne permettant pas de procéder directement à des analyses bioinformatiques contradictoires. Le CS note toutefois que cette lignée d'œillets a été cultivée depuis plus de dix ans sans qu'aucun effet négatif n'ait été signalé.

Risques de dissémination et impact sur l'environnement

Les risques potentiels pour l'environnement concernent le risque de dissémination des transgènes et ses conséquences. Suite à la mise sur le marché de fleurs coupées d'œillets génétiquement modifiés, les transgènes qu'ils portent pourraient théoriquement être disséminés suite à :

- une multiplication végétative : impossible naturellement à partir de fleurs coupées ; difficile mais possible par des techniques de bouturage spécifiques appliquées par des individus expérimentés ;

³ Ce résumé ne se substitue pas à l'analyse du dossier développée dans cet avis.

⁴ ORF (*Open Reading Frame*) : cadre ouvert de lecture, détecté par des programmes informatiques, correspondant à une séquence d'ADN qui peut coder, si elle est préalablement transcrite, une protéine ou un peptide (petite protéine).

- une dispersion de pollen vers d'autres œillets ou espèces apparentées : peu probable compte tenu : (1) de l'environnement dans lequel les plants coupés sont placés (essentiellement des habitations), (2) du fait que la pollinisation est uniquement entomophile (principalement des lépidoptères, qui n'ont pas un comportement de butinage optimal), (3) de la production de pollen relativement faible des œillets cultivés comparativement aux œillets « sauvages », (4) de la viabilité du pollen une fois qu'il est accessible aux insectes, c'est-à-dire une fois que la fleur est « ouverte », (5) de la durée de vie des plantes coupés, (6) de la distance de dispersion indiquée comme relativement courte (quelques centaines de mètres) ;
- une dispersion de graines qui se seraient développées sur les fleurs coupées : très improbable considérant notamment que le processus de développement des graines dure cinq semaines et qu'une fleur coupée en vase ne survit pas sur cette durée.

Plans de surveillance post-commercialisation

Le CS du HCB considère, avec le pétitionnaire, que l'absence de risques, en l'occurrence, ne rend pas utile un plan de surveillance spécifique.

Le pétitionnaire, afin d'être en accord avec la directive 2001/18/CE propose un plan de surveillance générale sur les sites de production en Amérique du Sud (ce qui ne concerne pas l'objet de la présente saisine), et auprès des organismes d'importation et des consommateurs au moyen d'un questionnaire. Il a aussi saisi un groupe d'experts pour réaliser une veille attentive et se propose d'opérer une traçabilité des exportations vers l'Union européenne. Le CS du HCB approuve l'approche générale et les méthodes du plan de surveillance générale indiquées par le pétitionnaire.

En conclusion

Au terme de l'analyse de l'ensemble des données fournies par le pétitionnaire et de données supplémentaires disponibles dans la littérature scientifique, le CS du HCB note que :

- aucun risque particulier de toxicité ni d'allergénicité n'a été détecté par le pétitionnaire dans les analyses expérimentales et bioinformatiques de la lignée d'œillet 1363-A, de la delphinidine ou de l'enzyme mutante ALS. Concernant les nouveaux ORF créés par la modification génétique, le pétitionnaire a mis en évidence, par analyse bioinformatique, l'existence de motifs protéiques de six acides aminés présents sur des toxines protéiques ou des protéines allergéniques connues. Il n'existe cependant pas de preuve sur la production de ces protéines, et a fortiori sur leur toxicité ou allergénicité.
- les données bioinformatiques étant fournies dans un fichier pdf, il n'est pas possible de les extraire pour procéder à des analyses indépendantes de celle du pétitionnaire. Le CS souhaite que les données de séquence soient fournies dans un fichier à partir duquel elles puissent être exploitées pour une analyse indépendante.
- Il est improbable que les fleurs coupées d'œillet produisent des graines; le risque de dissémination par des graines produites par ces fleurs est donc quasi nul.
- le risque de dissémination de gènes par le pollen des fleurs coupées d'œillet est faible mais non nul. Il ne lui serait cependant pas associé d'impact environnemental significatif.
- La dissémination par bouturage est difficile mais possible par des techniques adaptées.

Le CS recommande que la mise sur le marché des œillets génétiquement modifiés de la lignée 1363-A, si elle était autorisée, soit accompagnée de mesures propres à répondre au risque de dissémination par bouturage par une communication à l'attention des sociétés d'amateurs quant aux possibilités de diffusion non contrôlée des œillets transgéniques.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCTION | 5 |
| 2. CARACTERISTIQUES DES PLANTES GENETIQUEMENT MODIFIEES..... | 5 |
| 2.1 DESCRIPTION DU PRODUIT..... | 5 |
| 2.2 CARACTERISTIQUES DE LA CONSTRUCTION GENETIQUE..... | 5 |
| 2.3 METHODE DE TRANSFORMATION | 6 |
| 2.4 CARACTERISTIQUES DES CEILLETS 1363-A | 7 |
| 3. EVALUATION DES RISQUES POUR LA SANTE HUMAINE ET ANIMALE | 10 |
| 4. EVALUATION DES RISQUES POUR L'ENVIRONNEMENT | 12 |
| 4.1 DISSEMINATION POTENTIELLE DES TRANSGENES PAR BOUTURAGE..... | 12 |
| 4.2 DISSEMINATION POTENTIELLE DES TRANSGENES PAR LE POLLEN OU LES GRAINES | 13 |
| 5. PLAN DE SURVEILLANCE POST-COMMERCIALISATION | 14 |
| 6. CONCLUSIONS | 16 |
| 7. BIBLIOGRAPHIE | 16 |
| ANNEXE 1 : SAISINE | 19 |
| ANNEXE 2 : ELABORATION DE L'AVIS..... | 21 |

1. Introduction

Le dossier C/NL/97/13/01, déposé par la société Florigene auprès des autorités compétentes hollandaises dans le cadre de la directive 2001/18/CE⁵, est une demande de renouvellement d'autorisation pour l'importation, la distribution et la commercialisation de la lignée d'œillets transgéniques 1363A. En 1988, cette lignée, dont le nom commercial est MoonshadowTM, avait obtenu de la Commission Européenne une autorisation d'une durée de 10 ans non seulement pour l'importation mais aussi pour la culture. La présente demande n'inclut pas la culture. Elle ne concerne pas non plus la consommation animale et humaine.

Le Haut Conseil des biotechnologies est saisi par les autorités compétentes françaises (le Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche) pour éclairer la position du Gouvernement français lors du vote en Comité réglementaire à venir sur le projet de décision de la Commission Européenne concernant le renouvellement d'autorisation de l'importation demandée. Les avis des Etats Membres sur ce dossier sont d'autant plus importants qu'il n'a pas fait l'objet d'un examen par l'AESA⁶, celle-ci n'étant consultée par la Commission européenne que lorsque des Etats Membres maintiennent des objections motivées lors de la procédure d'évaluation définie par la directive 2001/18/CE.

2. Caractéristiques des plantes génétiquement modifiées

2.1 Description du produit

La lignée 1363-A est génétiquement modifiée dans le but de conférer aux fleurs une couleur pourpre-violette. Elle porte par ailleurs une résistance aux herbicides de la famille des sulfonylurées, utilisée pour la sélection des transformants primaires.

La couleur des fleurs est due à la concentration relative de deux classes de pigments, les caroténoïdes et les flavonoïdes, ces derniers ayant un rôle prépondérant. Les anthocyanidines constituent une sous-classe des flavonoïdes. Parmi ces pigments, la delphinidine, la cyanidine et la pélagonidine confèrent respectivement les couleurs bleu-violet, rose-rouge et orange-rouge. Deux enzymes jouent un rôle essentiel dans la voie de biosynthèse de ces pigments :

- la dihydroflavonol 4-réductase (DFR), qui est à l'origine de la production des précurseurs glucosylés de la pélagonidine, de la cyanidine et de la delphinidine en utilisant comme substrats respectifs le dihydrokaempférol (DHK), la dihydroxyquercétine (DHQ) ou la dihydromyricétine (DHM),
- la flavonoïde 3'-5'-hydroxylase (F3'5'H), qui assure par ailleurs l'hydroxylation des composés DHK et DHQ en DHM.

L'œillet est dépourvu du gène qui code l'enzyme F3'5'H. Afin de favoriser la voie de biosynthèse de la delphinidine, la lignée 1363-A exprime le gène *F3'5'H* de pensée et le gène *DFR* de pétunia.

2.2 Caractéristiques de la construction génétique

La construction transgénique à l'origine de l'événement 1363-A (MoonshadowTM) provient du plasmide binaire pCGP1991 (27 444 pb⁷) dont la région destinée au transfert (l'ADN de transfert, dit ADN-T) est présentée dans la figure 1. Elle porte trois cassettes d'expression

⁵ La directive 2001/18/CE est une directive du Parlement européen et du Conseil du 12 mars 2001 qui fixe les règles communautaires relatives à la dissémination volontaire d'OGM dans l'environnement. Elle abroge la directive 90/220/CEE du Conseil. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32001L0018:FR:HTML>

⁶ Autorité européenne de sécurité des aliments, ou EFSA : European Food Safety Authority.

⁷ pb : paire de bases d'ADN

situées entre des régions provenant d'un plasmide Ti⁸ d'une souche à octopine d'*Agrobacterium tumefaciens*, portant les séquences répétées gauche (LB⁹) et droite (RB¹⁰) délimitant la partie d'ADN transférée dans le génome des plantes, séparées par des régions intergéniques plus ou moins longues provenant des vecteurs utilisés pour les clonages (série des pBluescript et pUC). Il est à noter que la taille des régions du plasmide Ti, portant les frontières gauche et droite, est très largement supérieure à la taille fonctionnelle de ces régions (25 pb).

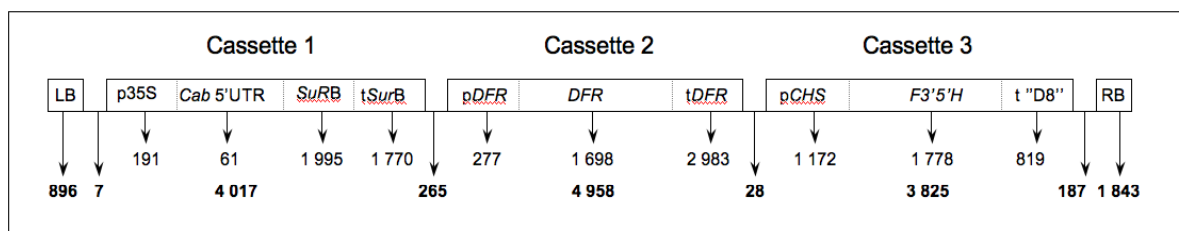


Figure 1. Carte de l'ADN-T du plasmide pCGP1991 destiné au transfert dans le génome de l'œillet pour l'obtention de la lignée transgénique 1363-A. p = promoteur, t = terminateur. Les chiffres représentent les tailles en paires de base. Schéma non à l'échelle. Les différences de taille entre la somme des tailles des diverses régions d'une cassette et la taille totale de la cassette pourraient refléter la présence potentielle de courtes régions provenant des plasmides de clonage entre les composants de chaque cassette.

La première cassette permet l'expression du gène *SuRB* (ALS) provenant de tabac (*Nicotiana tabacum*), conférant la résistance à des herbicides de la famille des sulfonilurées, placé sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) et de son propre terminateur de transcription (t*SuRB*). Une région de 61 pb, correspondant à la région 5' non-codante du gène *Cab* de pétunia (*Petunia X hybrida*), codant une protéine de fixation à la chlorophylle a/b, est présente en amont du gène pour optimiser son expression *in vivo*.

La deuxième cassette porte un gène *DFR* provenant de pétunia, cloné à partir d'ADN génomique, placé sous le contrôle de ses propres promoteur et terminateur de transcription. La protéine DFR produite par ce gène permet la production des précurseurs des pigments pélagonidine, cyanidine et delphinidine.

La troisième cassette porte le gène *F3'5'H* de pensée (*Viola hortensis*), sous forme d'ADN complémentaire, placé sous le contrôle du promoteur du gène codant la chalcone synthase (p*CHS*) de mufler (*Antirrhinum majus*) et du terminateur de la transcription du gène "D8", codant un homologue d'une protéine de transfert de phospholipides putative provenant de pétunia (t"D8"). La protéine F3'5'H assure la réduction du DHK et de la DHQ en DHM, un des précurseurs de la delphinidine.

Le CS observe que les figures fournies par le pétitionnaire ne sont pas conformes aux séquences données : il existe une confusion entre promoteurs et terminateurs, et la polarité des séquences est incertaine.

2.3 Méthode de transformation

A l'origine de la lignée 1363-A, la variété Unesco (UN), également appelée Striped Picolla, à fleurs blanches, a été inoculée par la souche AGL0 d'*A. tumefaciens* portant le plasmide binaire pCGP1991. Après élimination de l'agrobactérie avec l'antibiotique timentine, les transformants primaires ont été sélectionnés grâce à l'expression du gène *SuRB*, conférant la résistance à l'herbicide sulfuron. L'absence d'agrobactéries résiduelles dans les transformants primaires a été vérifiée par amplification PCR d'une région de 430 pb du gène *VirG* d'*A. tumefaciens*.

⁸ Ti : *Tumor inducing*, induisant une tumeur. Les souches virulentes d'*A. tumefaciens* induisent des tumeurs dans les plantes par le transfert de leur ADN-T dans le génome des plantes. Les souches utilisées pour la transgénèse ne sont plus virulentes car l'ADN-T ne contient plus les gènes sauvages nécessaires à cette virulence.

⁹ LB : *left border*, bordure gauche de l'ADN-T

¹⁰ RB : *right border*, bordure droite de l'ADN-T

2.4 Caractéristiques des œillets 1363-A

- Nombre de sites d'insertions et de copies des transgènes

Le nombre de sites d'insertion a été déterminé par des techniques de Southern, en utilisant une préparation d'ADN génomique de feuilles de plantes transgéniques et de leurs homologues non transformées. Deux enzymes de restriction différentes ont été utilisées séparément pour digérer l'ADN génomique. Deux enzymes de restriction différentes *EcoRI* et *PstI* ont été utilisées séparément pour digérer l'ADN génomique. Les produits de digestion ont été éprouvés avec des sondes radioactives correspondant à chaque cassette transférée, aux régions RB et LB, mais également avec 6 à 7 sondes couvrant la totalité de parties non transférées du plasmides binaire.

Le profil d'insertion est complexe dans la lignée 1363-A puisque les résultats indiquent la présence de plusieurs copies de chaque élément composant l'ADN-T en trois loci, ainsi qu'indiqué dans le tableau 1.

Le profil d'insertion est complexe pour la lignée 1363-A puisque les résultats indiquent la présence de plusieurs copies de chaque élément composant l'ADN-T en 3 loci, ainsi qu'indiqué dans le tableau 1, selon les données fournies par le pétitionnaire.

| Région de l'ADN-T | Estimation du nombre de copies intégrées | | |
|-------------------|--|--------------------|--|
| | Locus 1 | Locus 2 | Locus 3 |
| LB | 1 | 1 | 2 |
| SuRB | 1 | 1 + 1 ^a | 2 |
| DFR | 1 | 2 | 1 + 1 ^a |
| 3'5'H | 2 | 2 | 3 (dont une sans promoteur) ^a |
| RB | 2 | 2 | 3 |

Tableau 1. Nombre de loci d'insertion et nombre de copies de chaque élément des différentes cassettes de la construction, intégrés dans le génome de la lignée 1363-A d'œillet. ^a Données corrigées d'après les structures des inserts et leur séquence (confère paragraphe suivant) : une deuxième copie incomplète est présente (+1) ou une des copies mentionnées n'est pas complète (absence de promoteur).

Aucune autre région des plasmides binaires –en dehors de l'ADN-T– n'a été mise en évidence dans les expériences de Southern. Dans le cas de la lignée 1363-A, l'absence du gène plasmidique conférant la résistance à l'antibiotique tétracycline a été également vérifiée par PCR.

- Séquençage de l'insert et des régions flanquantes

La structure des inserts à chaque locus d'insertion est présentée dans les figures 1 à 3 de l'annexe A7 du dossier du pétitionnaire. Leur séquence est fournie dans l'annexe A8. Il est à noter de nombreuses discordances entre ces deux séries de données, d'une part sur la nature des séquences (plusieurs inversions promoteur/terminateur), d'autre part sur leur polarité (sens de la transcription). Les caractéristiques principales des inserts, déduites des données de séquence, sont présentées dans la figure 2. Elles montrent de profonds remaniements à chaque locus, qui se caractérisent par :

- l'absence fréquente des frontières gauche et droite ou leur modification aux extrémités des inserts,
- certaines cassettes peuvent être présentes sous des formes différentes, complète ou incomplète, orientation attendue ou orientation inverse, comparativement à la construction initiale,
- deux ou trois copies du même gène peuvent se retrouver au niveau d'un même insert, dans la même orientation ou en orientation inversée

Les nombres de copies de chaque cassette à chaque locus, déduit de ces présentations schématiques, diffèrent de ceux donnés par le pétitionnaire (confère Tableau 1 et corrections apportées dans ce tableau). Le pétitionnaire ne fait pas état de modifications dans les cadres de lecture (substitution ou insertion, mutation). La conformité des protéines potentiellement produites n'est donc pas spécifiée.

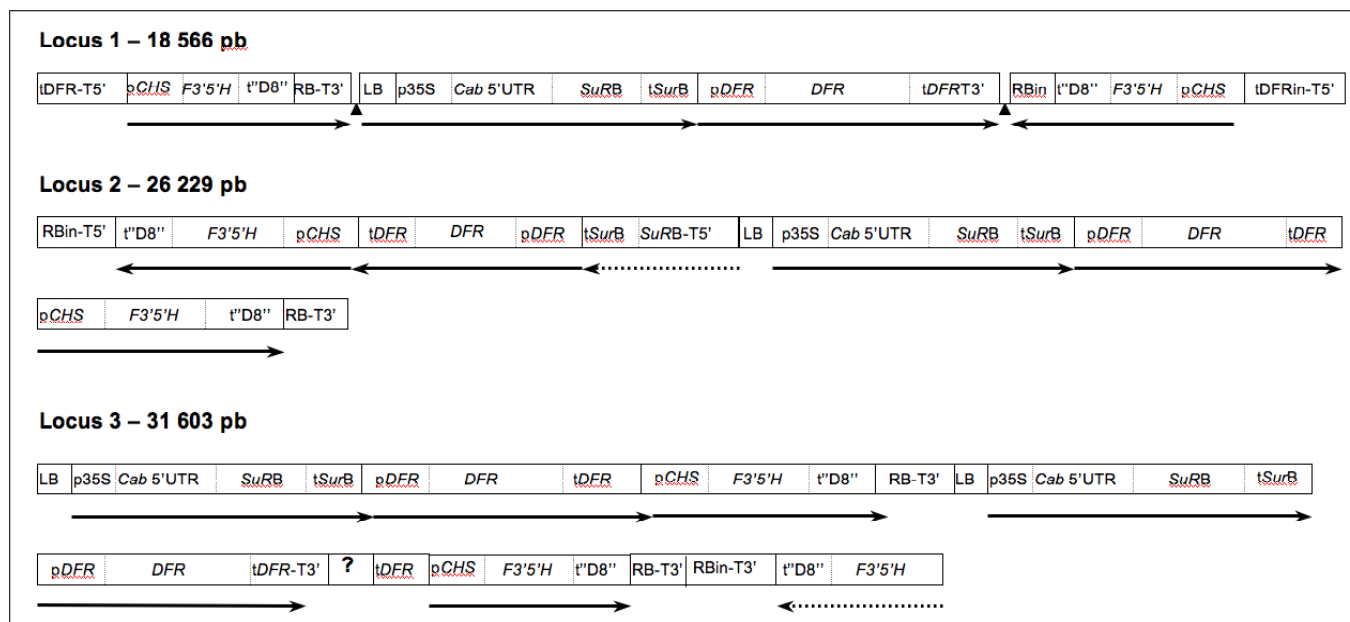


Figure 2. Principales caractéristiques des inserts intégrés aux trois loci d'insertion de la lignée 1363-A. Les régions non-codantes provenant des plasmides de clonage (cf. Fig. 1 à 3) ne figurent pas ici. Légende: p = promoteur; t = terminateur, T5' et T3': région tronquée en 5' ou 3'; in = séquence inversée comparativement à la séquence initiale; la flèche indique la polarité (en tirets en absence de promoteur); le triangle plein indique la présence de séquences ne provenant pas de l'ADN-T. (schéma non à l'échelle).

Les données sont fournies dans un fichier pdf duquel il n'est pas possible d'extraire les séquences pour de nouvelles analyses bioinformatiques. Le CS demande à ce que les données de séquence soient fournies dans un fichier à partir duquel elles puissent être exploitées pour de nouvelles analyses bioinformatiques.

Les séquences des 150 paires de base du génome de l'œillet, jouxtant chaque insert, sont fournies. L'insertion des ADN-T n'a, dans aucun cas, interrompu un gène de l'hôte receveur.

- Stabilité et héritabilité des transgènes et de leur phénotype dans les œillets

Les fleurs coupées, pour lesquelles l'autorisation d'import et de commercialisation est demandée, sont prélevées sur des plantes issues de bouturages successifs des transformants primaires. Le matériel transgénique ne sera pas utilisé dans des croisements avec d'autres cultivars d'œillet dans le cadre de cette demande. Le problème de l'héritabilité des transgènes n'a donc pas été abordé.

La stabilité des transgènes est déduite du maintien de la couleur violette-pourpre des fleurs après 42 bouturages successifs.

- Analyses bioinformatiques des ORF¹¹ potentiels présents dans les insertions

Les données de séquence ayant été fournies dans un fichier pdf global, il n'a pas été possible de les extraire pour procéder à des alignements ou des recherches d'homologies nucléotidique ou protéique dans les banques de données. Les descriptions suivantes résultent donc de l'examen des données fournies par le pétitionnaire, suite à des analyses bioinformatiques réalisées en décembre 2008 (résultats des analyses Blast en particulier).

Les données correspondant aux ORF détectés au niveau des jonctions des transgènes et de l'ADN génomique de l'œillet sont présentées dans le tableau 2.

| Locus | Nombre d'ORF | Taille en nucléotides | Homologie de séquence avec une protéine : | |
|---------|--------------|-----------------------|---|-----------|
| | | | Toxique | Allergène |
| Locus 1 | 27 | 24 à 528 | Oui (2) | Non |
| Locus 2 | 16 | 39 à 612 | Oui (1) | Oui (4) |
| Locus 3 | 18 | 27 à 1545 | Oui (2) | Oui (3) |

Tableau 2. Principales caractéristiques des ORF localisés au niveau des jonctions entre les transgènes et l'ADN génomique.

Parmi les peptides potentiellement produits par les 61 ORF identifiés aux trois loci d'insertion, cinq présentent des homologies de séquences avec des protéines toxiques connues, et sept avec des allergènes connus. L'homologie avec des protéines allergènes porte sur six acides aminés qui ne correspondent pas aux régions hydrophiles, et donc potentiellement allergènes, de ces protéines.

L'expression des transgènes a été contrôlée par deux approches : (1) par identification des ARN transcrits à partir des différentes cassettes par la méthode de northern ; (2) par dosage des trois pigments anthocyanes principaux par chromatographie haute pression (HPLC).

Des analyses northern ont été réalisées à partir d'ARN totaux extraits de pétales de plantes génétiquement modifiées ou non. Les différents ARN transcrits ont été recherchés à l'aide de sondes spécifiques. Les ARN de taille escomptée ont bien été identifiés.

Aucune quantification des ARN transcrits n'a été faite. De même, la présence d'ARN transcrit correspondant aux ORF potentiellement présents aux extrémités des inserts n'a pas été recherchée.

Par ailleurs, les concentrations des pigments delphinidine, cyanidine et pelargonidine des lignées transgéniques et des lignées parentales sont présentées dans le tableau 3.

| Lignée ou variété | Couleur des fleurs | Teneurs en pigments dans les pétales (mg/g de matière fraîche) | | |
|-------------------|--------------------|--|-----------|---------------|
| | | Delphinidine | Cyanidine | Pelargonidine |
| Variété Unesco | Blanche | 0 | 0,1 | 0 |
| Lignée 1363-A | Violette | 0,35 | 0,02 | 0 |

Tableau 3. Teneur des principaux pigments anthocyaniques dans les pétales d'œillets transgéniques et des variétés homologues non transformées.

¹¹ ORF (*Open Reading Frame*) : cadre ouvert de lecture, détecté par des programmes informatiques, correspondant à une séquence d'ADN qui peut coder, si elle est préalablement transcrite, une protéine ou un peptide (petite protéine). A la suite de la détection informatique d'un ORF, des analyses supplémentaires sont normalement réalisées pour tester s'il est effectivement transcrit en ARN et traduit en protéine ou en peptide.

La variété parentale (Unesco) n'a pas le pigment delphinidine comme attendu puisqu'elles ne possèdent pas le gène *F3'5'H*. L'expression de ce gène dans les lignées transgéniques, à des niveaux variables selon les lignées, se traduit par la présence du pigment, attestée par la couleur violette. La delphinidine n'a pas été détectée dans d'autres organes des plantes. Cette absence d'expression est expliquée par l'utilisation de promoteurs spécifiques des fleurs et l'expression du gène au moment de la floraison.

3. Evaluation des risques pour la santé humaine et animale

La demande concerne un usage exclusivement ornemental, les œillets ne sont pas destinés à l'alimentation humaine et animale. Dans l'hypothèse d'une consommation fortuite, par exemple dans le cas où les œillets seraient utilisés en décor de salade, le pétitionnaire a analysé la toxicité ainsi que le potentiel allergénique de la lignée 1363-A.

Les œillets sont utilisés à titre ornemental depuis des décennies, sans qu'aucun problème particulier de sécurité pour l'homme n'ait jamais été signalé. Les œillets ne sont pas connus comme étant des plantes toxiques ou allergisantes.

Aucune donnée ne fait état d'un risque particulier avec la variété réceptrice utilisée, Unesco, qui bénéficie d'un large historique d'utilisation.

La lignée 1363-A se distingue de la variété réceptrice par la production de delphinidine, responsable de la couleur violette des fleurs de cette lignée, et la production d'une acétolactase synthétase mutante de tabac, qui confère une résistance à des herbicides de la famille des sulfonilurées et a permis ainsi la sélection des transformants primaires. La lignée contient également soixante et un nouveaux ORF.

- Etude de toxicité aiguë

Une étude de toxicité par administration unique orale a été menée chez des groupes de cinq souris ICD mâle, selon le protocole OCDE 420 (Acute Oral toxicity – Acute Toxic). Un extrait aqueux de pétales d'œillet 1363-A a été administré à raison de 2g/kg de poids corporel, comparativement à un même extrait issu d'œillets non transgéniques. Les animaux ont été suivis pendant 14 jours puis autopsiés (Safety Science Institute, Suntory Ltd., Japan).

Aucune létalité et aucune altération macroscopique lors de l'autopsie n'ont été observées. Les évolutions du poids corporel des animaux testés ne diffèrent pas de ceux du groupe contrôle.

- Evaluation de la génotoxicité des œillets 1363-A

Un test de Ames¹² (Ames et al., 1973; Maron and Ames, 1983) a été conduit à partir d'extraits aqueux de feuilles et de pétales de fleurs sur quatre souches mutantes de *Salmonella typhimurium* (TA97, TA98, TA100 et TA102), avec et sans activation métabolique, par un laboratoire japonais appliquant les BPL¹³. La méthode par pré-incubation a été mise en œuvre avec des concentrations d'extrait aqueux de : 0,5, 1,25, 2,5, 3,75 ou 5 mg par puit. Parallèlement, quatre témoins positifs ont été testés.

Aucune augmentation significative du nombre de révertants des souches mutées de *Salmonella* n'a été observée et le test conclut à l'absence d'effet mutagène des œillets 1363-A.

Ce test amène deux commentaires critiques. Le dossier transmis ne comporte que les tableaux de résultats ; aucun détail méthodologique n'est disponible. De plus, le test n'est pas totalement conforme aux recommandations actuelles pour un test Ames, qui devrait inclure cinq souches dont TA1535 et TA1537, pas TA97 (ISO, 2003). Compte tenu de la nature de la demande, cette déviation ne présente toutefois pas un caractère rédhibitoire.

¹² Le test d'Ames est un test biologique permettant de déterminer le potentiel mutagène d'un composé chimique. Le protocole a été décrit par Bruce Ames.

¹³ BPL : bonnes pratiques de laboratoire

- Evaluation des risques potentiels associés à la delphinidine

La delphinidine, produite par modification génétique dans la lignée 1363-A dans le but de conférer une couleur violette aux fleurs d'œillet, existe naturellement dans beaucoup d'autres plantes (myrtilles, mûres...) et elle est également présente comme additif (E163b) dans de nombreux aliments. La delphinidine n'est pas connue pour être toxique ou allergène.

La delphinidine a été spécifiquement étudiée (en dehors de ce dossier) dans un test de Ames sur cinq souches de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537 et TA1538), avec et sans activation métabolique, sans montrer d'effet mutagène (Brown and Dietrich, 1979).

La delphinidine est absente des racines et des feuilles et présente dans les pétales au même titre, mais à des concentrations moindres, que d'autres pigments comme la cyanidine et la pélargonidine. La DL₅₀¹⁴ par voie orale d'un mélange de ces trois anthocyanes obtenu après extraction à partir de myrtilles est supérieure à 20 et 25 g/kg de poids corporel respectivement chez le rat et la souris (Pourrat et al., 1967). Les teneurs en delphinidine dans la lignée 1363-A sont du même ordre. Des teneurs plus importantes en delphinidine sont observées dans d'autres plantes ornementales.

Les anthocyanes ont fait l'objet de très nombreux travaux montrant des activités pharmacologiques variées, dont des propriétés anti-oxydantes (Kong et al., 2003, 2008).

On peut conclure que la delphinidine ne présente pas en soi de risque toxique, en particulier dans le cadre de leur présence dans des plantes à usage ornemental.

- Evaluation des risques potentiels associés à l'acétolactase synthétase mutante

L'acétolactate synthétase (ALS), ou acétohydroxyacide synthase, est une enzyme qui exerce deux rôles métaboliques (Duggleby and Pang, 2000) : un rôle anabolique dans les premières phases de biosynthèse des acides aminés branchés, et un rôle catabolique pour la production de butanediol uniquement chez certains micro-organismes.

La revue de Duggleby and Pang (2000) fait un état complet de la fonction biochimique de l'enzyme. L'acétolactate synthétase est présente dans les plantes, les bactéries et les champignons, absente chez les animaux. Chez les plantes, ALS catalyse la biosynthèse des acides aminés branchés leucine, valine et isoleucine. Les animaux ne synthétisent pas les acides aminés branchés. L'enzyme ALS est très labile et il est difficile de la purifier. Southan et Copeland ont purifié et caractérisé cette enzyme à partir du blé, mais elle n'a pas été isolée des œillets (Southan and Copeland, 1996).

L'enzyme ALS est inhibée par quatre classes d'herbicides : les sulfonilurées (Chaleff and Ray, 1984; Ray, 1984), les imidazolinines (Shaner et al., 1984), les triazolopyrimidines (Subramanian et al., 1990) et les pyrimidines.

La mutation du gène ALS conférant une résistance à certains herbicides a été observée dans plusieurs plantes : *Brassica napus*, *Xanthium sp.*, *Lactuca sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*.

La mutation du gène ALS a été utilisée dans différentes céréales (Newhouse et al., 1991). La relative facilité avec laquelle la plante résiste a été mise à profit par les sélectionneurs pour développer des plantes résistantes (Tan et al., 2005).

L'ALS mutante de tabac utilisée dans la lignée 1363-A, S4-Hra, est identique, sur le plan fonctionnel, aux nombreuses enzymes ALS retrouvées dans les plantes et les bactéries. La substitution d'un seul acide aminé lors de la mutation, conférant la résistance à l'herbicide, est observée dans diverses céréales et se produit naturellement chez les bactéries.

S4-Hra comme d'autres mutations d'ALS est considérée comme dénuée de toxicité par les agences réglementaires américaines et canadiennes. Enfin, l'homme consomme des aliments

¹⁴ DL₅₀ : DL signifie « dose létale ». La DL₅₀ est la quantité d'une matière, administrée en une seule fois, qui cause la mort de 50 % d'un groupe d'animaux d'essai. La DL₅₀ est une façon de mesurer le potentiel toxique à court terme (toxicité aiguë) d'une molécule.

issus de plantes qui expriment des enzymes similaires (même type de substitution) à la protéine codée par S4-Hra.

- **Evaluation des risques potentiels associés aux nouveaux ORF**

Parmi les peptides potentiellement produits par les 61 ORF identifiés aux trois loci d'insertion, cinq présentent des homologues de séquences avec des protéines toxiques connues, et sept avec des allergènes connus. Ces analyses d'homologie sont réalisées sur des intervalles de six acides aminés. Le CS note qu'une fenêtre d'analyse de six acides aminés est peu pertinente, la probabilité de retrouver par hasard une séquence de six acides aminés présente dans l'ensemble des allergènes connus étant non négligeable, et globalement considérée non fiable comme critère de prédiction allergénique (Hileman et al., 2002; Ladics et al., 2006; Silvanovich et al., 2006; Stadler and Stadler, 2003; Thomas et al., 2009). Il est recommandé de poursuivre l'évaluation du potentiel allergénique des ORF à partir d'un seuil d'homologie de huit acides aminés (EFSA, 2010; Thomas et al., 2009). Les homologues à des allergènes sont d'autant moins significatives qu'elles sont dans des régions qui ne correspondent pas aux régions hydrophiles, généralement exprimées à la surface de ces protéines. Cependant, aucune analyse complémentaire n'ayant été effectuée par le pétitionnaire, la production de ces protéines, et a fortiori leur potentiel toxique ou allergénique restent hypothétiques.

Les données étant fournies sous une forme non exploitable, il est impossible de réaliser de nouvelles analyses bioinformatiques à partir de ces données. Le CS demande à ce que les données de séquence soient fournies dans un fichier à partir duquel elles puissent être exploitées pour des analyses bioinformatiques. Le CS note toutefois que cette lignée d'œillets a été cultivée depuis plus de 10 ans sans qu'aucun effet négatif n'ait été signalé.

Le CS accepte les conclusions du pétitionnaire selon lesquelles aucun risque particulier de toxicité ni d'allergénicité n'a été détecté. Le CS reconnaît la validité de la méthodologie des analyses expérimentales et bioinformatiques de la lignée d'œillet 1363-A, concernant la delphinidine, l'enzyme mutante ALS ou les nouveaux ORF créés par la modification génétique.

4. Evaluation des risques pour l'environnement

Les risques potentiels pour l'environnement concernent le risque de dissémination des transgènes et ses conséquences. Suite à la mise sur le marché de fleurs coupées d'œillets génétiquement modifiés, les transgènes qu'ils portent pourraient théoriquement être disséminés suite à une multiplication par bouturage, une dispersion de pollen vers d'autres œillets ou espèces apparentées, ou une dispersion de graines qui se seraient développées sur les fleurs coupées.

4.1 Dissémination potentielle des transgènes par bouturage

L'œillet ne peut se disséminer naturellement via multiplication végétative car les plants ne peuvent produire « naturellement » des stolons, des rhizomes, des bulbes, etc. Les œillets ne peuvent produire dans la nature de plants « régénérés » à partir de fragments de tissus. Le pétitionnaire et un expert cité dans le dossier indiquent dans ce sens qu'aucun œillet cultivé de l'espèce *Dianthus caryophyllus* n'a été observé en dehors des champs de production issus de fragments de tissus. D'autres espèces d'œillets cultivés sont observées hors des champs de production en Europe (Tutin and Walters, 1993) mais il s'agirait plutôt dans ce cas de populations férales (Holzner and Immonen, 1982) plutôt que de plants issus de fragments de tissus.

Des plants d'œillets pourraient, en revanche, être produits à partir de tissus de plants transgéniques *via* des techniques de bouturages (cultures de tissus ou autres techniques de multiplication). Cela dit, les œillets transgéniques étant commercialisés sous forme de fleurs coupées, les techniques optimales de multiplication végétative par enracinement de boutures végétatives prélevés sur des pieds-mères seront impossibles, étant donné que les tiges de fleurs coupées sont dépourvues de telles boutures végétatives. Il serait cependant possible

de multiplier ces oeillets génétiquement modifiés en enracinant des tronçons des tiges florales, soit *in vitro*, soit dans un substrat adapté (ex : sable, sable et terre, perlite) (Thomas et al., 2003). En effet, il existe à l'aisselle de chaque feuille un bourgeon végétatif dormant que l'on peut développer en enracinant les tronçons de tige en condition d'humidité élevée ou bien *in vitro* (Meena and Shanti, 2006) (Jean-Paul Onesto, communication personnelle au titre d'expert). Le pourcentage de réussite est peu élevé mais un amateur éclairé peut réaliser cette opération pour se constituer un lot de plantes qu'il pourra utiliser soit pour son jardin soit pour réaliser des hybridations avec d'autres oeillets (*Dianthus caryophyllus*, *Dianthus sp.*) afin de créer de nouvelles variétés. Il y a là un risque de transfert de gène des oeillets transgéniques et donc perte de la maîtrise de la diffusion des variétés transgéniques proposées par le pétitionnaire. Compte tenu de la forte adaptabilité écologique des *Dianthus sp.* (Wu, 2007) et des possibilités d'hybridations interspécifiques (Atanasova, 1998; Nimura et al., 2006; Nimura et al., 2008) le risque de voir ces oeillets transgéniques être installés par des amateurs dans des zones de croissance d'autres *Dianthus* ne peut pas être exclu.

Ces dérives pourraient avoir lieu même si la production d'oeillets transgéniques est protégée par des brevets, et même si Florigene indique clairement que le matériel produit illégalement serait détruit. Dans le dossier et dans la réponse aux commentaires des Etats Membres, le pétitionnaire indique que si une dissémination non contrôlée avait lieu par cette technique de multiplication, celle-ci n'aurait pas d'impact environnemental. Si on peut légitimement arguer que les transgènes impliqués dans la synthèse de delphinidine et le gène de tolérance aux sulfonylurées sont déjà présents *in natura*, il pourrait être cependant nécessaire d'évaluer les conséquences de l'augmentation de la fréquence de ces gènes notamment dans un contexte de conservation des ressources génétiques *via* des phénomènes d'hybridation (cf paragraphe suivant).

4.2 Dissémination potentielle des transgènes par le pollen ou les graines

Les deux autres voies de dispersion de gènes à partir des fleurs coupées impliquent une dispersion *via* le pollen et les graines.

L'éventualité d'une pollinisation à partir de plants coupés d'oeillets cultivés est relativement faible compte tenu : (1) de l'environnement dans lequel les plants coupés sont placés (essentiellement des habitations), (2) du fait que la pollinisation est uniquement entomophile (principalement des lépidoptères, qui n'ont pas un comportement de butinage optimal), (3) de la production de pollen relativement faible des oeillets cultivés comparativement aux oeillets « sauvages », (4) de la viabilité du pollen une fois qu'il est accessible aux insectes, c'est-à-dire une fois que la fleur est « ouverte », (5) de la durée de vie des plantes coupées, (6) de la distance de dispersion indiquée comme relativement courte (quelques centaines de mètres).

Cette pollinisation par le pollen des plants coupés n'est cependant pas nulle. La dispersion du pollen pourrait avoir principalement lieu quand la plante est commercialisée chez les fleuristes, pendant le transport après l'achat chez le fleuriste et dans le lieu où l'acheteur disposera les fleurs. Dans le dernier cas, il s'agira principalement d'un lieu d'habitation mais il n'est cependant pas exclu que les plantes soient posées à l'extérieur, par exemple lors d'une cérémonie. La présence de pollinisateurs à proximité des fleurs coupées, même réduite n'est donc pas à exclure. Concernant la pollinisation par les insectes, même si la pollinisation semble principalement assurée par des lépidoptères (noctuelles et sphinx), les fleurs d'oeillets peuvent être visitées marginalement par les abeilles et les syrphes (cas de *D. silvester*; (Erhardt, 1988)) ce qui élargit le spectre des pollinisateurs potentiels.

Concernant les estimations de dispersion de pollen dans le genre *Dianthus*, celles-ci sont très difficilement réalisables avec des marqueurs génétiques de type microsatellites (T. Giraud, communication personnelle). La centaine de mètres qui est donnée comme la distance de pollinisation par les insectes (Nilsson et al., 1992) est donc une moyenne très « générale » qui ne présume pas d'événements de dispersion relativement rare mais à plus longue distance, cette estimation dans le cas des oeillets étant difficilement réalisable. Si la probabilité d'une dispersion de pollen efficace (produisant des graines) est faible, il faut cependant considérer que les événements d'hybridation entre espèces du genre *Dianthus* par le biais des pollinisateurs sont possibles, bien qu'il soit indiqué qu'aucun événement d'hybridation n'ait été observé dans la nature entre l'oeillet cultivé et les autres espèces de *Dianthus*. Aucune

références bibliographiques ne permettent étayer cet argument. Quatorze espèces de *Dianthus* ont été identifiées comme s'hybridant potentiellement avec *D. caryophyllus* (hybridations forcées réalisées dans le sens espèces sauvages vers espèces cultivées dans le but d'introgresser des caractères génétiques intéressants), dont l'œillet des dunes (*D. gallicus*) qui est une espèce protégée au niveau national en France (Annexe I et II, *Arrêté ministériel du 20 janvier 1982 modifié le 31 août 1995*). Si ces hybridations sont possibles, il est néanmoins impossible de prédire la probabilité d'introgession (ie maintien) du transgène dans les populations sauvages. L'impact de cette introgression sur la conservation des ressources génétiques est actuellement difficilement quantifiable.

Le risque de dispersion par le pollen produit par ces fleurs coupées reste donc une opération difficile et de faible rendement nécessitant l'intervention d'un insecte pollinisateur (Tidke and Dharamkar, 2007) ou bien de l'homme (Gargano et al., 2009).

Enfin, la dispersion *via* des graines produites par les plantes coupées devrait être très réduite voire irréalisable en pratique considérant notamment que le processus de développement des graines dure cinq semaines et qu'une fleur coupée en vase ne survit pas sur cette durée. De plus, il semble difficile d'avoir une pollinisation des fleurs coupées avant la récolte car celles-ci sont encore fermées et carpelle et étamines ne sont pas suffisamment développés (Kim et al., 2005a; Kim et al., 2005b). De plus, si la pollinisation avait eu lieu celle-ci augmentant la production d'éthylène accélérerait la sénescence de la fleur (Finger and Barbosa, 2006; Halevy, 1986). Compte tenu de ces éléments, la dispersion *via* des graines produites par les fleurs coupées semble donc improbable.

5. Plan de surveillance post-commercialisation

En matière de surveillance post-commercialisation, la directive 2001/18/CE, complétée par les règlements (CE) 1829/2003¹⁵ et 1830/2003¹⁶, prévoit que soient mis en place :

- un plan de surveillance spécifique, pour tester d'éventuelles hypothèses sur des effets négatifs de la plante génétiquement modifiée dans le cadre de son utilisation et de l'évaluation du risque environnemental. Le plan de surveillance spécifique est destiné à mettre en évidence les changements prévisibles.
- un plan de surveillance générale, pour observer d'éventuels effets non intentionnels ou non anticipés sur la santé humaine et animale ainsi que sur l'environnement. Le plan de surveillance générale vise à mettre en évidence les changements non prévus par les plans de surveillance spécifique.

Toute la pertinence de ces plans réside dans la notion de risque pour la santé humaine et animale et pour l'environnement. Considérant l'analyse de risques effectuée dans les chapitres précédents, pointer des risques liés à d'éventuelles hypothèses sur des effets négatifs de la plante génétiquement modifiée en France ou en Europe, dans le cadre d'une importation de fleurs coupées à usage ornemental, qui ne seront pas cultivées en Europe et qui seront transportées dans des conditions de transport particulièrement surveillées, relèverait de la spéculation infondée dans les conditions particulières de demande d'autorisation.

Afin de lever toute ambiguïté sur l'utilisation qui doit être faite de ces fleurs coupées, la société Florigene propose de diffuser des instructions écrites aux distributeurs et d'apposer une mention spécifique sur les produits vendus. Les informations aux distributeurs, outre l'identification du produit, des restrictions commerciales et des coordonnées de la société Florigene, porteront clairement la mention : « Ce produit est un œillet génétiquement modifié qui ne doit pas être consommé (hommes et animaux) ni cultivé ». Cet étiquetage sera effectué

¹⁵ Le règlement (CE) 1829/2003 est un règlement du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments, consistant en, ou contenant des, ou issus d'organismes génétiquement modifiés, pour l'alimentation humaine et animale.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003R1829:FR:HTML>

¹⁶ Le règlement (CE) 1830/2003 est un règlement du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant la traçabilité et l'étiquetage des organismes génétiquement modifiés et la traçabilité des produits destinés à l'alimentation humaine ou animale produits à partir d'organismes génétiquement modifiés, et modifiant la directive 2001/18/CE. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003R1830:FR:HTML>

par le biais d'accessoires distribués aux fleuristes (autocollants, carte-cadeaux, rubans, etc.) et remis aux consommateurs. Une information sera faite en outre auprès des professionnels et du grand public au moyen de prospectus et plaquettes et d'un site internet.

Le plan de surveillance générale, qui vise à mettre en évidence des effets non prévus par les plans de surveillance spécifique, s'articule autour de plusieurs démarches complémentaires. La surveillance sur les sites de production en Amérique du Sud ne concerne pas l'objet de la présente saisine qui ne devrait traiter que des aspects liés à l'importation de fleurs coupées dans l'Union européenne, seule autorisation demandée.

Bien qu'il n'existe aucune obligation pour la société australienne Florigene d'indiquer dans quelles conditions elle produit les œillets en Colombie et en Equateur, deux pays qui possèdent des législations et réglementations souveraines, la société Florigene a précisé que les conditions de culture sur plus de 5000 ha en Colombie n'ont eu aucun effet d'ordre alimentaire, ni sur la consommation humaine ni sur la consommation animale, dans les régions concernées. La société Florigene indique également que les herbicides sulfonyles ne sont pas utilisés dans ces zones de production d'œillets. Des précisions sur les conditions et le développement économiques ainsi engendrés, ainsi que sur la formation des producteurs et personnels des organismes de réglementations sud-américains en ce qui concerne les spécificités de la production transgénique, ont été apportées. Des visites régulières de la société Florigene sur les sites de production sont réalisées.

Dans le cadre de l'importation des œillets génétiquement modifiés, la société Florigene opère une veille attentive grâce à un groupe d'experts et se propose d'opérer une traçabilité des exportations vers l'Union européenne. Les sociétés d'importation sont soumises à des questionnaires tous les six mois sur la distribution du produit et l'observation d'effets négatifs inattendus. Ces sociétés sont listées sur un site internet, ce qui permet le retour par ce biais de l'avis des consommateurs en Allemagne, Royaume-Uni et France sur ce produit floral ornemental. Le groupe d'experts rassemble des sélectionneurs et des botanistes appartenant à des institutions ou sociétés privées (sélectionneurs) et des universités de renom européennes (botanistes) de différents pays européens : Royaume-Uni, Italie, Allemagne, Suède, Danemark, Suisse, Grèce et France. Une surveillance est opérée par ces experts dans les zones où sont produits des œillets en Europe. Une région pilote en Andalousie a été retenue en raison de sa haute productivité en œillets. A la demande des experts, des analyses moléculaires et des tests de résistance aux herbicides pour vérifier l'absence d'hybrides transgéniques seront diligentés. Des méthodes de détection par PCR sont par ailleurs en cours de développement. Ces méthodes ne sont pas obligatoires étant donné que ces dossiers ne concernent pas un produit alimentaire. Le CS recommande toutefois que ces méthodes de détection soient fournies aux Autorités compétentes afin de permettre une surveillance post-commerciale et une bio-vigilance du territoire.

Un rapport annuel sera remis aux organismes compétents de chaque Etat Membre (en France, la Direction de la qualité et de la protection des Végétaux du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche), et la liste des destinataires indiquée dans le dossier sera élargie si nécessaire. Ce rapport annuel indiquera les quantités de fleurs importées par variétés, par semaine au cours de l'année écoulée, par sociétés d'importation et par localisation. Il mentionnera également : (1) les actions de surveillance diligentées par le groupe d'experts avec les dates, les localisations et les surfaces impliquées ; (2) si d'improbables hybridations ont été observées ; (3) les observations sur des populations d'œillets qui s'effectueraient en dehors des sites de culture. Florigene indique que la surveillance s'opérera au-delà de la période d'importation des fleurs coupées pour une période de douze mois.

En conclusion, en accord avec le pétitionnaire, le CS du HCB prend acte que dans les conditions de la saisine, un plan de surveillance spécifique n'est pas nécessaire. Il approuve l'approche générale et les méthodes du plan de surveillance générale proposé par le pétitionnaire.

6. Conclusions

Au terme de l'analyse de l'ensemble des données fournies par le pétitionnaire et de données supplémentaires disponibles dans la littérature scientifique, le CS du HCB note que :

- aucun risque particulier de toxicité ni d'allergénicité n'a été détecté par le pétitionnaire dans les analyses expérimentales et bioinformatiques de la lignée d'œillet 1363-A, de la delphinidine ou de l'enzyme mutante ALS. Concernant les nouveaux ORF créés par la modification génétique, le pétitionnaire a mis en évidence, par analyse bioinformatique, l'existence de motifs protéiques de six acides aminés présents sur des toxines protéiques ou des protéines allergéniques connues. Il n'existe cependant pas de preuve sur la production de ces protéines, et a fortiori sur leur toxicité ou allergénicité.
- les données bioinformatiques étant fournies dans un fichier pdf, il n'est pas possible de les extraire pour procéder à des analyses indépendantes de celle du pétitionnaire. Le CS souhaite que les données de séquence soient fournies dans un fichier à partir duquel elles puissent être exploitées pour une analyse indépendante.
- Il est improbable que les fleurs coupées d'œillet produisent des graines; le risque de dissémination par des graines produites par ces fleurs est donc quasi nul.
- le risque de dissémination de gènes par le pollen des fleurs coupées d'œillet est faible mais non nul. Il ne lui serait cependant pas associé d'impact environnemental significatif.
- La dissémination par bouturage est difficile mais possible par des techniques adaptées.

Le CS recommande que la mise sur le marché des œillets génétiquement modifiés 1363-A, si elle était autorisée, soit accompagnée de mesures propres à répondre au risque de dissémination par bouturage par une communication à l'attention des sociétés d'amateurs quant aux possibilités de diffusion non contrôlée des œillets transgéniques.

7. Bibliographie

Ames, B.N., Lee, F.D., and Durston, W.E. (1973). Improved bacterial test system for detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 782-786.

Atanasova, B. (1998). Investigation of the possibility of crossing carnation (*D. caryophyllus*) with some wild species of the genus *Dianthus*. *Rastenievdni-Nauki* 35.

Brown, J.P., and Dietrich, P.S. (1979). Mutagenicity of plant flavonols in the Salmonella-mammalian microsome test - activation of flavonol glycosides by mixed glycosidases from rat cecal bacteria and other sources. *Mutat Res* 66, 223-240.

Chaleff, R.S., and Ray, T.B. (1984). Herbicide-resistant mutants from tobacco cell-cultures. *Science* 223, 1148-1151.

Duggleby, R.G., and Pang, S.S. (2000). Acetohydroxyacid synthase. *J Biochem Mol Biol* 33, 1-36.

EFSA (2010). Scientific Opinion on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and feed. *The EFSA Journal* 8, 168pp.

Erhardt, A. (1988). Pollination and reproduction in *Dianthus silvester* Wulf. In *Proceedings of the Tenth International Symposium on the Sexual Reproduction of Higher Plants*, M. Cresti, P. Gori, and E. Pacini, eds. (Berlin, Germany, Springer-Verlag), pp. 351-356.

Finger, F.L., and Barbosa, J.G. (2006). Postharvest physiology of cut flowers. In *Advances in postharvest technologies for horticultural crops*, B. Noureddine, and S. Norio, eds. (Kerala, Research Signpost), pp. 373-393.

Gargano, D., Gullo, T., and Bernardo, L. (2009). Do inefficient selfing and inbreeding depression challenge the persistence of the rare *Dianthus guliae* Janka (Caryophyllaceae)? Influence of reproductive traits on a plant's proneness to extinction. *Plant Species Biol* 24, 69-76.

Halevy, A.H. (1986). Pollination-induced corolla senescence. *Acta Hort* 181, 25-32.

Hileman, R.E., Silvanovich, A., Goodman, R.E., Rice, E.A., Holleschak, G., Astwood, J.D., and Hefle, S.L. (2002). Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *Int Arch Allergy Immunol* 128, 280-291.

Holzner, W., and Immonen, R. (1982). Europe: an overview. In *Biology and ecology of weeds*, W. Holzner, and M. Numata, eds. (The Hague, NL, W. Junk), pp. 203-226.

ISO (2003). ISO 10993-3:2003. Biological evaluation of medical devices -- Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity (Geneva, Switzerland, International Organization for Standardization).

Kim, Y.A., Joung, H.Y., Kwon, O.K., and Shin, H.K. (2005a). Morphological Observation of Anther and Pollen by Stages of Flower Development for Improvement of the Breeding Efficiency in Carnation 'Desio'. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology* 23, 446-450.

Kim, Y.A., Joung, H.Y., and Shin, H.K. (2005b). Morphological Observation of Floral Organs to Investigate the Cause of Poor Pollen Formation in Carnation 'Desio'. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology* 23, 440-445.

Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., and Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64, 923-933.

Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., and Brouillard, R. (2008). Analysis and biological activities of anthocyanins (vol 64, pg 923, 2003). *Phytochemistry* 69, 1939-1940.

Ladics, G.S., Bardina, L., Cressman, R.F., Mattsson, J.L., and Sampson, H.A. (2006). Lack of cross-reactivity between the *Bacillus thuringiensis* derived protein Cry1F in maize grain and dust mite Der p7 protein with human sera positive for Der p7-IgE. *Regul Toxicol Pharmacol* 44, 136-143.

Maron, D.M., and Ames, B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113, 173-215.

Meena, W., and Shanti, P. (2006). In vitro propagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Annals of Plant Physiology* 20, 29-34.

Newhouse, K., Singh, B., Shaner, D., and Stidham, M. (1991). Mutations in corn (*Zea-mays* L) conferring resistance to imidazolinone herbicides. *Theor Appl Genet* 83, 65-70.

Nilsson, L.A., Rabakonandrianina, E., and Pettersson, B. (1992). Exact tracking of pollen transfer and mating in plants. *Nature* 360, 666-668.

Nimura, M., Kato, J., and Mii, M. (2006). Interspecific hybrid production by reciprocal crosses between *Dianthus caryophyllus* L. and *Dianthus x isensis* Hirahata et Kitamura. *J Horticult Sci Biotechnol* 81, 995-1001.

- Nimura, M., Kato, J., Mii, M., and Ohishi, K. (2008). Cross-compatibility and the polyploidy of progenies in reciprocal backcrosses between diploid carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) and its amphidiploid with *Dianthus japonicus* Thunb. *Sci Hortic* 115, 183-189.
- Pourrat, H., Bastide, P., Dorier, P., and Tronche, P. (1967). Préparation et activité thérapeutique de quelques glycosides d'anthocyanes. *Chim Thérap*, 33-38.
- Ray, T.B. (1984). Site of action of chlorsulfuron - inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plant Physiol* 75, 827-831.
- Shaner, D.L., Anderson, P.C., and Stidham, M.A. (1984). Imidazolinones - potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol* 76, 545-546.
- Silvanovich, A., Nemeth, M.A., Song, P., Herman, R., Tagliani, L., and Bannon, G.A. (2006). The value of short amino acid sequence matches for prediction of protein allergenicity. *Toxicol Sci* 90, 252-258.
- Southan, M.D., and Copeland, L. (1996). Physical and kinetic properties of acetohydroxyacid synthase from wheat leaves. *Physiol Plant* 98, 824-832.
- Stadler, M.B., and Stadler, B.M. (2003). Allergenicity prediction by protein sequence. *FASEB J* 17, 1141-+.
- Subramanian, M.V., Hung, H.Y., Dias, J.M., Miner, V.W., Butler, J.H., and Jachetta, J.J. (1990). Properties of mutant acetolactate synthases resistant to triazolopyrimidine sulfonanilide. *Plant Physiol* 94, 239-244.
- Tan, S.Y., Evans, R.R., Dahmer, M.L., Singh, B.K., and Shaner, D.L. (2005). Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manage Sci* 61, 246-257.
- Thomas, K., MacIntosh, S., Bannon, G., Herouet-Guichenev, C., Holsapple, M., Ladics, G., McClain, S., Vieths, S., Woolhiser, M., and Privalle, L. (2009). Scientific advancement of novel protein allergenicity evaluation: An overview of work from the HESI Protein Allergenicity Technical Committee (2000-2008). *Food Chem Toxicol* 47, 1041-1050.
- Thomas, L.M., Gonsalves, S., Mandal, T., and Roychowdhury, N. (2003). Effect of different media on rooting of cuttings of carnation cv. Mixed Super Chaubaud. *Journal of Interacademia* 7, 262-264.
- Tidke, J.A., and Dharamkar, R.O. (2007). A Study on some aspects of pollination biology of winter ornamental plants. In *Advances in pollen spore research*, S.R.A. J., ed. (New Delhi, India, Today & Tomorrow's Printers and Publishers), pp. 129-139.
- Tutin, T.G., and Walters, S.M. (1993). *Dianthus* L. In *Flora europaea*, T.G. Tutin, V.H. Heywood, N.A. Burges, D.H. Valentine, and D.M. Moore, eds. (Cambridge, Cambridge University Press), pp. 227-246.
- Wu, S. (2007). Introduction and Cultivation of *Dianthus* sp. *Journal of Northeast Forestry University* 35, 84-86.

Annexe 1 : Saisine



MINISTÈRE DE L'ALIMENTATION, DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE

Direction générale de
l'alimentation

Service de la prévention
des risques sanitaires de
la production primaire

Sous direction de la
qualité et de la protection
des végétaux

Bureau de la
biovigilance, des
biotechnologies et de la
qualité des végétaux

251, rue de Vaugirard
75732 Paris cedex 15

Madame BRECHIGNAC
Présidente du Haut conseil des
biotechnologies
à l'attention de Monsieur Hamid Ouahioune
3 place de Fontenoy
75007 PARIS

- 5 DEC. 2009

Paris, le

Objet : Informations complémentaires relatives aux dossiers de mise sur le marché d'oeillets génétiquement modifiés

Références : 091201-saisine HCB- info compl oeillet

Affaire suivie par : Anne Grevet

tél. : 01 49 55 58 25 fax : 01 49 55 49 59
courriel : anne.grevet@agriculture.gouv.fr

PJ : informations complémentaires relatives aux dossiers C/NL/09/01, C/NL/09/02 et C/NL/97/13-01

Madame la Présidente,

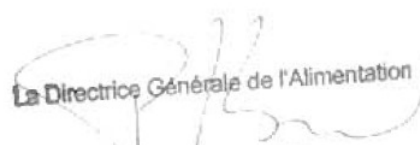
Dans le cadre de la directive 2001/18/CE, l'évaluation initiale des demandes de mise sur le marché d'OGM est confiée à l'Etat membre qui a reçu le dossier. Lorsque cet Etat membre a transmis son rapport d'évaluation, le dossier est adressé à l'ensemble des États membres qui disposent de 60 jours pour faire des commentaires, demander des informations complémentaires ou émettre des objections à la mise sur le marché. Dans ce cadre, le Haut Conseil des biotechnologies a été saisi en août dernier sur trois dossiers relatifs à des oeillets génétiquement modifiés (C/NL/09/01, C/NL/09/02 et C/NL/97/13-01).

En réponses aux commentaires des États membres, le pétitionnaire a apporté des informations complémentaires, qui ont été diffusées aux États membres par la Commission européenne. Conformément à la directive 2001/18/CE, les États membres disposent de 45 jours pour indiquer s'ils maintiennent ou non leurs objections à la mise sur le marché des OGM. Ils peuvent répondre jusqu'au 8 janvier 2010.

Vous trouverez ci-joint les informations complémentaires apportées par le demandeur pour les trois dossiers C/NL/09/01, C/NL/09/02 et C/NL/97/13-01.

Dans ce contexte, j'ai l'honneur de vous demander, par la présente saisine, de bien vouloir procéder à une évaluation des trois dossiers et des informations complémentaires afin de rendre un avis au plus tard le 4 janvier 2010.

Je vous prie de croire, Madame la Présidente, à l'assurance de ma considération distinguée.


La Directrice Générale de l'Alimentation
Pascale BRIAND

Annexe 2 : Elaboration de l'avis

L'avis a été élaboré par le CS du HCB, composé de :

Jean-Christophe Pagès, Président, Jean-Jacques Leguay, Vice-Président,

et par ordre alphabétique des noms de famille : Yves Bertheau, Pascal Boireau, Denis Bourguet, Florence Coignard, François-Christophe Coléno, Jean-Luc Darlix, Elie Dassa, Maryse Deguergue, Hubert de Verneuil, Robert Drillien, Anne Dubart-Kupperchmitt, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Mireille Jacquemond, André Jestin, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Jane Lecomte, Olivier Le Gall, Yvon Le Maho, Didier Lereclus, Patrice Mannoni, Rémy Maximilien, Antoine Messéan, Bertrand Ney, Jacques Pagès, Daniel Parzy, Catherine Regnault-Roger, Pierre Rougé, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Virginie Tournay.

Aucun membre du CS n'a déclaré avoir de conflits d'intérêts qui auraient pu interférer avec son analyse du dossier.

Un rapporteur extérieur, Jean-Paul Onesto de l'INRA, a été sollicité pour compléter l'expertise du CS. M. Onesto a signé un engagement de confidentialité, et a certifié son absence de conflits d'intérêts après avoir pris connaissance du dossier. Il a fourni une analyse du dossier dans son domaine d'expertise, et a été auditionné par le CS. Il n'a toutefois pas contribué directement à la rédaction de l'avis du CS.