



HAL
open science

HCB__ Avis sur les risques environnementaux et sanitaires liés à la mise sur le marché de pétunias génétiquement modifiés non-autorisés

. Comité Scientifique Du Haut Conseil Des Biotechnologies, Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno B. Chauvel, Cécile Collonnier, Denis Couvet, et al.

► To cite this version:

. Comité Scientifique Du Haut Conseil Des Biotechnologies, Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, et al.. HCB__ Avis sur les risques environnementaux et sanitaires liés à la mise sur le marché de pétunias génétiquement modifiés non-autorisés. [0] Inrae. 2017. hal-02789212

HAL Id: hal-02789212

<https://hal.inrae.fr/hal-02789212v1>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

COMITE SCIENTIFIQUE

**AVIS SUR LES RISQUES ENVIRONNEMENTAUX ET
SANITAIRES LIES A LA MISE SUR LE MARCHE DE
PETUNIAS GENETIQUEMENT MODIFIES NON-
AUTORISES**

Paris, le 22 juin 2017

Table des matières

TABLE DES MATIERES	2
INTRODUCTION	4
SAISINE ET OBJET DE L'AVIS	4
AVIS	5
ANNEXE I. ANALYSES SCIENTIFIQUES D'EXPERTS DU CS CONSIDEREES POUR LA REDACTION DE L'AVIS.....	7
1. DESCRIPTION MOLECULAIRE DU PETUNIA TRANSGENIQUE	7
1.1. CARACTERISTIQUES DES PLANTES GENETIQUEMENT MODIFIEES	7
1.1.1. DESCRIPTION DU PRODUIT	7
1.1.2. CARACTERISTIQUES DE LA CONSTRUCTION GENETIQUE.....	7
1.2. METHODE DE TRANSFORMATION ET CARACTERISTIQUES DU PETUNIA TRANSGENIQUE INITIAL.....	8
1.2.1. CARACTERISTIQUES DU PETUNIA MODIFIE INITIALEMENT	9
2. BIOLOGIE, MODE DE REPRODUCTION, CAPACITE A PERSISTER ET A SE DISSEMINER DANS L'ENVIRONNEMENT.....	10
2.1. TAXONOMIE, ORIGINE	10
2.2. BIOLOGIE, REPRODUCTION ET DISSEMINATION	10
2.3. HYBRIDATION AVEC D'AUTRES ESPECES	11
2.4. ÉVALUATION COMPARATIVE DES VARIETES TRANSGENIQUES	11
2.5. CONCLUSION	12
3. EVALUATION DES RISQUES ENVIRONNEMENTAUX ASSOCIES A LA PRESENCE SUR LE MARCHE DE PETUNIAS GENETIQUEMENT MODIFIES	12
3.1. POSSIBILITES DE NATURALISATION DES PETUNIAS GENETIQUEMENT MODIFIES	12
3.2. INTEGRATION DANS LES RESEAUX TROPHIQUES	13
3.3. INTERACTION AVEC LES INSECTES POLLINISATEURS	13
3.4. INTERACTION AVEC LES ORGANISMES DU SOL.....	14
3.5. CONCLUSION	14
4. RISQUE DE TRANSFERT DU TRANSGENE AUX BACTERIES DE L'ENVIRONNEMENT.....	14
4.1. POSSIBILITE DE TRANSFERT DE L'ADN DU TRANSGENE.....	14
4.2. POSSIBILITE DE MODIFICATION PHENOTYPIQUE DE BACTERIES PATHOGENES DE L'HOMME SUITE AU TRANSFERT A PARTIR DE PLANTES TRANSGENIQUES	15
4.3. POSSIBILITE DE TRANSFERT DE GENES ENTRE PLANTES TRANSGENIQUES ET BACTERIES DE L'ENVIRONNEMENT.....	16

4.4.	IMPACT SUR L'ÉQUILIBRE POPULATIONNEL ET FONCTIONNEL DE LA COMMUNAUTÉ BACTÉRIENNE	18
4.5.	CONCLUSION	18
5.	RISQUES SANITAIRES	18
5.1.	LA MODIFICATION GÉNÉTIQUE DE LA COULEUR DE LA FLEUR DE PETUNIA	18
5.2.	RISQUES POUR LA SANTÉ ANIMALE	20
5.3.	RISQUES POUR LA SANTÉ HUMAINE	20
5.4.	ALLÉRÈNES DE PLANTES.....	22
5.5.	CONCLUSIONS.....	23
6.	BIBLIOGRAPHIE	24
 ANNEXE II. SAISINE.....		27
ANNEXE III. LISTE DES MEMBRES DU COMITÉ SCIENTIFIQUE.....		28

Introduction

Saisine et objet de l'avis

Suite à la détection, par la Finlande, de pétunias transgéniques non-autorisés à la mise sur le marché, la Commission européenne en a informé la France. Une procédure de retrait du marché de ces pétunias a été établie par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) en concertation avec les professionnels. Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a parallèlement été saisi le 19 mai 2017 par le Directeur Général de l'Alimentation¹ d'une demande d'expertise concernant les risques environnementaux et sanitaires liés à la présence de ces pétunias génétiquement modifiés non-autorisés sur le territoire français.

Le Comité scientifique (CS)² du HCB a rendu l'avis suivant.

¹ Saisine reproduite en Annexe II.

² La composition du comité scientifique du HCB est disponible en Annexe III.

Avis

Interrogé sur les risques environnementaux et sanitaires qui pourraient résulter de la présence dans le commerce de plants dérivés d'un *Petunia hybrida* transgénique non autorisés, le CS a, faute de dossier de demande de commercialisation dans le cadre de l'Union européenne (UE), fondé son analyse sur les informations disponibles dans plusieurs publications scientifiques traitant de la biologie de *Petunia hybrida*. Le travail du CS est aussi fondé sur l'hypothèse de la saisine, selon laquelle les plantes commercialisées sans autorisation seraient dérivées de l'événement de transformation décrit dans la publication de Meyer et collaborateurs (Meyer et al., 1987)³.

Dans le cadre d'un programme de recherche, des plantes de pétunia aux fleurs rose saumon ont été obtenues après transfert d'un gène de maïs codant la dihydroquercitine 4-réductase, enzyme impliquée dans la synthèse de flavonoïdes (Meyer et al., 1987). Ces plantes expriment aussi le gène *nptII* de résistance à la kanamycine. L'analyse du CS porte sur les connaissances actuelles relatives à ces deux caractéristiques, dans le contexte de la biologie de *Petunia hybrida* :

- Les différentes études réalisées suite à l'obtention de ces pétunias montrent une certaine instabilité du phénotype de couleur des fleurs, celle-ci est due en grande partie à l'extinction de l'expression du transgène, notamment par méthylation du promoteur 35S. Le CS indique donc qu'il ne sera pas toujours possible d'identifier les pétunias transgéniques en s'appuyant uniquement sur la couleur de la fleur.

- Les pétunias sont des fleurs ornementales non pérennes. La dispersion dans l'environnement des transgènes d'un *Petunia hybrida* génétiquement modifié ne semble possible que dans les cas suivants :

- semis intentionnel de semences qui auraient été récoltées soit sur une plante transgénique (possiblement une plante isolée s'étant autofécondée), soit sur une variété conventionnelle qui aurait été pollinisée par une plante transgénique ;
- propagation intentionnelle par bouturage.

Dans les deux cas, les pétunias étant des plantes géliges et ne se ressemant pas spontanément, les transgènes ne pourront se maintenir pendant plusieurs années qu'en cas de multiplication intentionnelle renouvelée, par semis ou bouturage. Ces deux modes de propagation sont possibles mais ne peuvent être réalisés que par des jardiniers amateurs. Ainsi, l'arrêt de la commercialisation et l'information de ces jardiniers amateurs, pouvant éventuellement détenir des boutures ou des graines de ces pétunias, devraient permettre de limiter fortement le risque de maintien dans l'environnement.

Les données biologiques suggèrent que *Petunia hybrida* aurait une capacité à se ressemer et à se maintenir spontanément sous un climat tropical ou sub-tropical (DROM-COM). Ainsi, les pétunias

³ Meyer, P., Heidmann, I., Forkmann, G., and Saedler, H. (1987). A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* 330, 677–678.

transgéniques pourraient se maintenir dans les DROM-COM. Toutefois, le CS indique qu'à ce jour, la naturalisation de *Petunia hybrida*, indépendamment de tout caractère transgénique, n'a pas été rapportée dans les DROM-COM.

- L'impact de la modification génétique sur les organismes qui seraient exposés à ce pétunia semble limité, aussi bien pour les quelques animaux consommant ses feuilles, que pour les insectes pollinisateurs.

- Les risques de transfert de gènes de la plante transgénique vers les bactéries des sols sont extrêmement faibles et les conséquences de tels événements, s'ils venaient à se produire, sont *a priori* négligeables pour la santé humaine ou animale et pour l'environnement.

- L'évaluation réglementaire d'un risque sanitaire nécessiterait que des données quantitatives relatives à la teneur en pélargonine dans les pétunias génétiquement modifiés soient disponibles. Cependant, considérant le « *weight of evidence* », base de l'évaluation d'un risque potentiel de toxicité et d'allergénicité, le CS du HCB estime que les données de la littérature relatives à la pélargonine, compte tenu de sa présence dans de nombreux autres végétaux consommés en alimentation humaine, ne sont pas de nature à faire craindre un danger particulier.

En conclusion, le CS n'identifie pas de risque environnemental ou sanitaire qui nécessiterait la mise en œuvre d'une surveillance particulière.

Deux membres du CS considèrent que les risques environnementaux sont difficiles à identifier et/ou sans doute très faibles.

Annexe I. Analyses scientifiques d'experts du CS considérées pour la rédaction de l'avis

1. Description moléculaire du pétunia transgénique

Des plantes de pétunia aux fleurs rouge saumon ont été obtenues après transfert du gène *A1* de dihydroquercitine 4-réductase de maïs impliqué dans la synthèse de flavonoïdes. Ces plantes expriment aussi le gène *nptII* de résistance à la kanamycine. Les différentes études réalisées suite à l'obtention de ces plantes, montrent une certaine instabilité du phénotype de couleur des fleurs, due en grande partie au *silencing* du transgène de synthèse de flavonoïde par méthylation du promoteur 35S constituant ce transgène.

1.1. Caractéristiques des plantes génétiquement modifiées

1.1.1. Description du produit

Ce pétunia transgénique exprime un gène qui modifie la couleur des fleurs ainsi qu'un gène qui confère la résistance à la kanamycine. La description de la région transgénique de ce pétunia a été réalisée à partir des publications (Bashandy and Teeri, 2017; Meyer et al., 1987), sous réserve que ce pétunia dérive bien du pétunia initialement décrit par Meyer et al. (1987).

1.1.2. Caractéristiques de la construction génétique

La construction génétique à l'origine de cet événement provient très certainement du plasmide p35A1 (Meyer et al, 1987). Ce plasmide d'environ 8 kb porte deux gènes, un gène codant une dihydroquercitine 4-réductase A1 (DQR) du maïs et un gène codant la néomycine transférase 2 du transposon Tn5 d'*E. coli*.

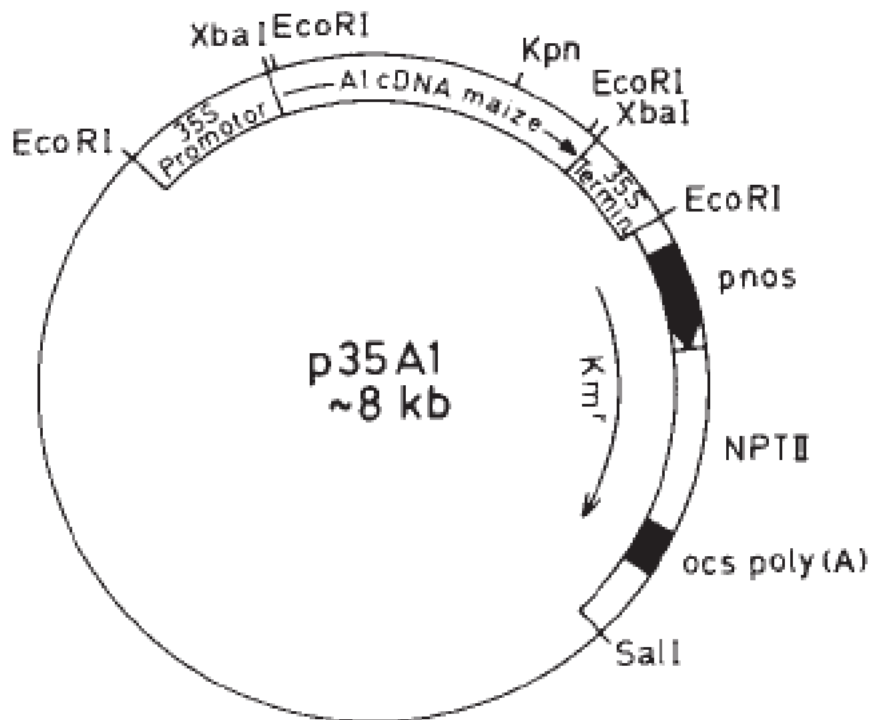


Fig 1 : Carte du plasmide p35A1

Plus précisément, le 1^{er} transgène est constitué :

- du promoteur de l'ARN 35S du CaMV (constitutif) ;
- de la séquence codante (ADN-c) du gène A1 de la dihydroquercitine 4-réductase du maïs ;
- du terminateur de l'ARN 35S du CaMV.

Le deuxième transgène est constitué :

- du promoteur du gène de la nopaline synthase de l'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens* ;
- de la séquence codante du gène de la néomycine transférase 2 du transposon Tn5 d'*E. coli*, conférant la résistance à la kanamycine ;
- du terminateur de la nopaline synthase de l'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Le vecteur p35A1 dérive du plasmide pBR322 qui porte une origine de répliation ainsi que le gène *bla* conférant la résistance à l'ampicilline aux bactéries hébergeant ce plasmide.

1.2. Méthode de transformation et caractéristiques du pétunia transgénique initial

Des protoplastes d'un mutant RL01 de pétunia à fleur blanche qui accumule le dihydrokaempferol, ont été transformés par transfert direct de gène avec le plasmide p35A1. La méthode de transformation utilisée fait intervenir le polyéthylène glycol (PEG) ainsi que l'aphidicoline afin de synchroniser les protoplastes en début de phase S du cycle cellulaire. Les cellules dérivées des

protoplastes traités ont ensuite été sélectionnées sur un milieu contenant de la kanamycine. Les colonies résistantes ont été ensuite régénérées en plantes entières.

1.2.1. Caractéristiques du *pétunia modifié initialement*

Nombre de sites d'insertion, nombre de copies par insertion et structure des inserts et expression des transgènes

Dans la publication de (Meyer et al., 1987), seul le clone RP35-15 montrant une coloration rouge brique uniforme des fleurs a été étudié. Une expérience de *northern blot* montre que cette plante exprime l'ARNm du gène *A1* de la dihydroquercitine 4-réductase du maïs. L'analyse des flavonoïdes indique que cette plante accumule la pélargonidine 3-glucoside, suite à l'activité enzymatique de la DQR sur le dihydrokaempferol.

Il n'y a pas, dans cette publication initiale, de description du nombre de site d'insertion ni du nombre de copie d'insertion des transgènes, ni de la structure du ou des inserts, ni de séquence du ou des inserts et de leurs régions flanquantes.

Cependant la publication de (Linn et al., 1990), donne plus de détails sur les plantes transgéniques obtenues lors de cette expérience de transformation. Sur les 30 plantes indépendantes résistantes à la kanamycine obtenues, 23 possédaient les deux transgènes et celles-ci ont été plus précisément étudiées par des analyses de type Southern blots et de méthylation de l'ADN. Ces plantes montrent des phénotypes variables de couleurs de fleurs et différents patterns d'intégration des transgènes. Ces plantes possèdent un nombre variable de copies des transgènes et montre aussi des profils de méthylation dans la région du promoteur 35S qui varient en fonction du phénotype des plantes (phénomène de « *silencing* » des transgènes).

Il n'y a pas de correspondance directe entre le nom de la lignée transgénique présentée dans la publication de (Meyer et al., 1987) et celle de (Linn et al., 1990), néanmoins, il s'agit très probablement d'une lignée présentant une seule copie des transgènes intégrée à un locus, comme par exemple la lignée 235/1-24 ou 235/1-17 de la publication de (Linn et al., 1990). Pour cette lignée, le profil d'intégration de l'ADN transgénique semble être celui présenté dans la figure 2.

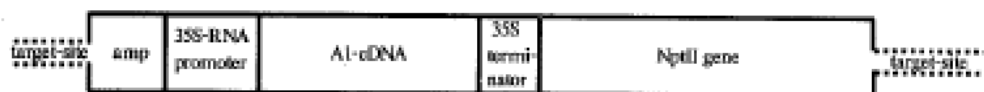


Figure 2 : Profil d'intégration probable du transgène dans le pétunia.

(Bashandy and Teeri, 2017) ont réalisé, sur des plantes de pétunia présumées dérivées du pétunia initial (Meyer et al., 1987), quelques expériences de RT-PCR qui montrent que celles-ci expriment le gène *A1* de maïs et le gène *nptII*. Des expériences de PCR et de séquençage montrent que les deux transgènes sont présents. Une région du plasmide portant la partie du gène *bla* située entre le gène *bla* et le promoteur 35S serait aussi intégrée mais pas la région située entre le gène *bla* et le terminateur *nos* du gène *nptII*.

Stabilité et héritabilité des transgènes et de leur phénotype

L'étude de 30 000 descendants hétérozygotes de la lignée 235/1-17 (Linn et al., 1990) a été réalisée par (Meyer et al., 1992). Cette étude a d'ailleurs fait l'objet d'une demande d'autorisation de culture en plein champ auprès de l'autorité compétente allemande (BVL, 1997). Cette plante présente le profil d'intégration indiqué ci-dessus et il est indiqué que 215pb du génome de pétunia ont été délétées lors de l'insertion du fragment transgénique et que cette insertion est unique.

Les conclusions de cette étude montrent une certaine instabilité du phénotype avec un retour à des fleurs blanches à une fréquence de 10^{-4} , due à une délétion dans le gène *A1* ou encore une atténuation de la couleur des fleurs ou encore à des fleurs de couleur hétérogène (« variegated ») à des fréquences variant de 2×10^{-3} à plusieurs dizaines de pourcent suivant les lots de graines, l'âge des plantes, les conditions environnementales, etc. Ces variations sont dues au phénomène de méthylation du promoteur 35S (« gene silencing »).

Enfin, la société S&G Seeds (Oud et al., 1995) a utilisé, avec succès, deux transformants initiaux (MPI-15 et MPI-17 dont il est probable qu'il s'agisse des transformants 235/1-15 et 235/1-17 de la publication (Linn et al., 1990) comme parents dans des croisements faisant intervenir des variétés cultivées de pétunia de différents fonds génétiques présentant des couleurs de fleurs légèrement différentes du pétunia RL01 afin d'obtenir des pétunias aux fleurs de couleurs variées, ayant potentiellement un intérêt commercial.

2. Biologie, mode de reproduction, capacité à persister et à se disséminer dans l'environnement

2.1. Taxonomie, origine

Le genre *Petunia* appartient à la famille des solanacées et compte une trentaine d'espèces, toutes originaires d'Amérique du sud. L'espèce horticole *Petunia hybrida* résulte de croisements artificiels réalisés au début du 19^{ème} siècle entre *Petunia axillaris* et *Petunia integrifolia* (Segatto et al., 2014). C'est une espèce diploïde, comme les deux espèces parentales.

2.2. Biologie, reproduction et dissémination

C'est une plante annuelle avec une durée du cycle de trois à quatre mois, qui est dépendante de la température, la croissance étant la plus rapide à des températures entre 25 et 30°C (Vandenbussche et al., 2016). La multiplication végétative par bouturage est très facile (Gerats and Vandenbussche, 2005).

Petunia hybrida généralement commercialisé est majoritairement auto-compatible et capable d'autofécondation, mais il existe également un système d'auto-incompatibilité à base génétique rendant l'allogamie obligatoire. La majorité des variétés cultivées sont auto-compatibles donc capables de s'autoféconder et la production de semences est alors importante (Oloumi and Rezanejad, 2009). Dans la nature les espèces du genre *Petunia* sont fécondées par des insectes :

papillons de nuit pour *P. axillaris*, abeilles pour *P. integrifolia*. D'autres espèces sont fécondées par des oiseaux-mouches.

C'est une espèce gélive du fait de l'origine sub-tropicale des espèces parentes. L'établissement à partir de semis spontané ne semble jamais avoir été observé en Europe, bien que l'espèce soit cultivée couramment depuis plus de cent ans (BVL, 1997).

2.3. Hybridation avec d'autres espèces

Les barrières à l'hybridation dans le genre *Petunia* sont pré-zygotiques et les croisements entre espèces donnent des diploïdes comme les parents (Vandenbussche et al., 2016). Le croisement artificiel entre *P. axillaris* et *P. integrifolia*, à l'origine de *P. hybrida* est très facile. Par contre ce croisement ne s'observe pas spontanément dans la nature, bien que les deux espèces co-existent (sympatrie) dans leur aire d'origine ; cela s'expliquant en partie par des guildes d'insectes pollinisateurs différentes (Dell'Olivo et al., 2011). Le *Petunia* horticole étant un hybride récent, il doit pouvoir se croiser, au moins artificiellement, avec les 2 espèces parentes, *Petunia axillaris* et *Petunia hybrida*. Ces deux espèces parentes ne sont pas présentes naturellement en Europe.



Figure 3 : Carte de distribution de l'espèce *P. axillaris* et du complexe *P. integrifolia*

2.4. Évaluation comparative des variétés transgéniques

Le transgène a été introduit depuis la variété transformée d'origine vers différents fonds génétiques variétaux afin de stabiliser le caractère de couleur des fleurs (Oud et al., 1995). Une évaluation au champ des lignées de *backcross* F4 et F5 a été effectuée en Floride aux Etats Unis (probablement en 1993). Les traits de vigueur, le port et les caractères floraux des plantes transgéniques ont été trouvés similaires à ceux de variétés types utilisées comme contrôles (Oud et al., 1995).

2.5. Conclusion

- La dispersion dans l'environnement du transgène d'un *Petunia hybrida* génétiquement modifié ne semble possible que dans les cas suivants :
 - semis intentionnel de semences qui auraient été récoltées soit sur une plante transgénique (possiblement une plante isolée s'étant autofécondée), soit sur une variété conventionnelle qui aurait été fécondée par du pollen d'une plante transgénique ;
 - propagation intentionnelle par bouturage.

Cependant l'arrêt de la commercialisation et l'information des jardiniers amateurs gardant des boutures ou des graines de ces pétunias devraient permettre de fortement limiter ce risque de maintien dans l'environnement.

- Dans les deux cas, les plantes étant gélives et ne se ressemant pas spontanément, le transgène ne pourra se maintenir pendant plusieurs années qu'en cas de multiplication intentionnelle renouvelée, par semis ou bouturage.
- La capacité à se ressemer et se maintenir sous un climat tropical ou sub-tropical (DROM-COM) reste à évaluer.

3. Evaluation des risques environnementaux associés à la présence sur le marché de pétunias génétiquement modifiés

Comme toute plante, le pétunia se trouve impliqué dans différents réseaux d'interactions : les plantes sont à la base des réseaux trophiques aériens et souterrains et certaines interagissent avec des organismes pollinisateurs. Les risques environnementaux associés à la présence sur le marché de pétunias génétiquement modifiés sont donc similaires à ceux associés à l'introduction d'espèces exotiques, modulés par les éventuelles modifications des traits d'histoire de vie liées à l'insertion d'un transgène (toxicité, changement du taux de croissance, etc.).

3.1. Possibilités de naturalisation des Pétunias génétiquement modifiés

Du fait de leur utilisation importante à des fins ornementales (parc, jardins, balcons...), plusieurs espèces de pétunias (*P. axillaris*, *P. integrifolia*, *P. hybrida*) sont présents dans les territoires français (sauf Saint-Martin et Saint-Barthélemy). Seul *P. hybrida* semble s'être naturalisé à la Réunion et en Nouvelle Calédonie (Base de donnée TAXREF, (Gargominy et al.) https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/112833). Il existe cependant des informations contradictoires quant à l'observation de cette naturalisation qui semble pointer vers une erreur dans la base de donnée TAXREF (la base de donnée du Conservatoire Botanique du Masquarin, à l'origine du référencement de ce pétunia dans TAXREF, indique une présence de pétunias en culture mais pas de naturalisation ni de caractère envahissant http://mascarine.cbnm.org/index.php/flore/index-de-la-flore/nom?code_taxref=446020).

L'évaluation des risques réalisée par les autorités allemandes dans le cadre d'une demande d'autorisation de mise en culture au champ (BVL, 1997) précise que, bien qu'étant massivement utilisés à des fins horticoles, les pétunias (toute espèce) ne peuvent se naturaliser en Allemagne, les graines étant très sensibles au froid humide et ne survivant pas à l'hiver. De plus, cette évaluation indique également que le pétunia RL01 génétiquement modifié ne présente pas de caractère de compétitivité particulier comparé aux pétunias non OGM (BVL, 1997). Sur le territoire métropolitain, la présence de pétunias génétiquement modifiés semble donc limitée à leur utilisation horticole (parcs, jardins, balcons...).

Compte tenu de ces différents éléments, la naturalisation des pétunias OGM sur le territoire métropolitain semble peu probable. Une vigilance plus importante pourra être cependant nécessaire sur les territoires de La Réunion et de Nouvelle-Calédonie, certains pétunias ornementaux pourraient éventuellement se naturaliser bien que cette information n'ait pas été vérifiée par des observations.

3.2. Intégration dans les réseaux trophiques

Les pigments anthocyane dans les pétunias, dont la chaîne de biosynthèse a été génétiquement modifiée, ont des rôles multiples dans les interactions entre les plantes et d'autres organismes. D'une part, lorsqu'ils sont présents dans les fleurs, ces pigments déterminent en partie le type d'organisme qui les pollinise (voir plus bas). D'autre part, ces pigments colorés peuvent avoir un rôle dans la résistance aux prédateurs (herbivorie et florivorie).

La florivorie est décrite sur certaines variétés de *P. hybrida* non modifiées (Johnson et al., 2008) et dépend de la quantité d'anthocyanes présente dans les pétales, le taux de florivorie étant plus faible sur des fleurs pigmentées que sur des fleurs non pigmentées. Bien que la synthèse de pélargonidine soit nouvelle pour le genre *Petunia*, la présence de pélargonidine dans les tissus ne devrait pas conduire à une résistance accrue à l'herbivorie comparée aux Pétunias présentant d'autres types d'anthocyanes en circulation sur le marché. Par ailleurs, bien que le gène *A1* soit sous le contrôle d'un promoteur constitutif, l'accumulation de leucopélargonidine et de ses dérivés ne devrait se faire que dans les organes contenant des quantités notables de dihydrokampaferol (pétales).

Les éléments transgéniques ou les modifications physiologiques auxquelles ils conduisent ne présentant pas de toxicité particulière (la leucopélargonidine et ses dérivés sont des pigments que l'on trouve chez d'autres fleurs courantes comme les *Pelargonium* (géraniums) voir infra), les risques environnementaux liés à l'herbivorie de Pétunias génétiquement modifiés semblent très réduits.

3.3. Interaction avec les insectes pollinisateurs

Le genre *Petunia* est un genre comprenant 35 espèces, qui présente la particularité d'être pollinisé par une grande variété d'animaux : insectes (Hyménoptères, Lépidoptères) et oiseaux. Plusieurs études ont pu mettre en évidence le rôle de gènes particuliers déterminant la taille des fleurs (Stuurman, 2004), la couleur (Hoballah et al., 2007), la réflectance UV (Sheehan et al., 2015) ou même l'odeur (Klahre et al., 2011) et dont l'expression ou non conduit aux différents syndrômes de pollinisation observés entre les différentes espèces de pétunias. Les deux espèces dont est issu *P.*

hybrida sont pollinisées par des organismes différents (Klahre et al., 2011) : *P. integrifolia*, aux fleurs colorées, à tube relativement court, peu odorante et contenant peu de récompenses (nectar) est pollinisé principalement par des Hyménoptères ; au contraire, *P. axillaris*, aux fleurs blanches, à tube long, très odorantes et présentant beaucoup de récompenses est pollinisé par des papillons de nuit (Sphingidés). La pollinisation de l'hybride n'est (*a priori*) pas décrite. La lignée RL01 est fertile avec d'autres variétés de pétunias, une partie de la diversification des colorations ayant été obtenue par croisements simples entre l'hybride transformé et d'autres lignées hybrides (Oud et al., 1995). Comme les pétunias génétiquement modifiés présentent des fleurs colorées de grande taille, ils sont probablement pollinisés par des Hyménoptères généralistes (abeilles domestiques, bourdons...), des pollinisations de Sphingidés ont aussi été observées.

Au même titre que les risques environnementaux liés à l'herbivorie, les risques environnementaux liés aux interactions entre pétunias génétiquement modifiés et organismes pollinisateurs devraient être limités.

3.4. Interaction avec les organismes du sol

Au cours de leur croissance, les plantes interagissent avec les organismes du sol (apport de carbone, prélèvement de nutriments...). Les modifications apportées par l'insertion du transgène dans ces pétunias ne sont pas de nature à avoir des conséquences sur le fonctionnement des sols et les cycles biogéochimiques, même si les plantes venaient à se naturaliser.

3.5. Conclusion

- Malgré la possibilité que les pétunias puissent se maintenir dans la nature dans certaines conditions trouvées dans les DROM-COM, ceci n'a pas été rapporté dans les documents qui ont pu être consultés.
- L'impact de la modification génétique sur les organismes qui seraient exposés à ce pétunia semble limité aussi bien pour les quelques animaux consommant ses feuilles que pour les insectes pollinisateurs.
- Le changement de couleur des fleurs peut modifier l'appétence de certains animaux susceptibles de les consommer.
- La modification génétique ne devrait pas avoir un impact sur le fonctionnement des sols et les cycles biogéochimiques même dans l'hypothèse peu probable d'une naturalisation de ces plantes.

4. Risque de transfert du transgène aux bactéries de l'environnement.

4.1. Possibilité de transfert de l'ADN du transgène

Le transgène de ces plantes génétiquement modifiées contient le gène *A1* codant une dihydroquercitine 4-reductase qui transforme le dihydrokaempferol qui s'est accumulé du fait d'une mutation dans le métabolisme des anthocyanes en leucopélargonidine responsable de la couleur

orangée de ces plantes OGM. Sont également présents sur le transgène le gène *nptII*, utilisé comme marqueur de sélection ainsi que d'autres fragments résultant de la transformation par le vecteur p35A1, lui-même dérivé de pBR322 pourvu d'une origine de réplication et d'un gène codant la résistance à l'ampicilline, mais ces fragments comportent des délétions empêchant toute expression dans la plante.

Les séquences promotrices (35S) et terminatrices sont celles du Cauliflower mosaic virus (CaMV), du gène de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (séquence promotrice) et du gène de l'octopine synthase (séquence terminatrice) d'*Agrobacterium tumefaciens*.

La possibilité de transfert de l'ADN du transgène est liée à la présence de séquences procaryotiques qui peuvent être intégrées par recombinaison homologue ou homéologue dans les régions de forte similarité nucléotidique présentes dans les génomes bactériens à des fréquences significatives, donc détectables (voir ci-dessous). Signalons qu'en théorie les autres séquences typiquement végétales des génomes des plantes OGM pourraient également être intégrées dans les génomes bactériens par recombinaison illégitime mais à des fréquences extrêmement faibles. De plus, de telles séquences constituant un fardeau génétique pour la bactérie puisque ne pouvant s'y exprimer ne sont généralement pas fixées dans ces génomes.

4.2. Possibilité de modification phénotypique de bactéries pathogènes de l'homme suite au transfert à partir de plantes transgéniques

La probabilité de modification phénotypique de bactéries pathogènes de l'homme suite au transfert à partir de plantes transgéniques de la résistance induite par le gène *nptII* est très faible. Plusieurs événements, qui indépendamment ont une probabilité d'occurrence très faible, doivent successivement se réaliser pour qu'un tel scénario se produise.

- Le point le plus important est le franchissement de la barrière génétique bactérienne nécessitant une similarité de séquences entre les gènes clonés dans la plante et le génome des bactéries du sol. Cette similarité de séquences est en effet indispensable à l'étape de recombinaison homologue ou homéologue. En laboratoire, des événements de transfert plantes transgéniques-bactéries ont été détectés seulement si cette condition moléculaire est remplie (voir plus bas). Le transfert dans des zones sans forte similarité demeure théoriquement possible, impliquant un mécanisme de recombinaison illégitime mais ne pouvant se réaliser qu'à des fréquences extrêmement faibles, de plusieurs ordres de grandeur inférieures à la recombinaison homologue. Ces données indiquent que le gène *nptII* de la plante ne pourrait être potentiellement transféré que dans le génome des bactéries possédant déjà ce gène, sans même ajouter une copie supplémentaire mais en remplaçant la copie existante.

- Du fait du système d'expression eucaryote de la construction du gène *nptII* dans la plante transgénique, l'expression de ce gène dans les bactéries réceptrices nécessiterait des séquences d'expression procaryotes préexistant dans la zone d'insertion du transgène ou captées lors de son transfert.

- De plus, pour qu'un tel transfert ait des conséquences en santé humaine ou animale, il faudrait que les bactéries réceptrices du gène *nptII* soient des pathogènes d'hommes ou d'animaux dont le

traitement nécessite l'usage d'antibiotiques contre lesquels *nptII* confère une résistance ou qu'un second événement de transfert se réalise entre une bactérie saprophyte du sol qui aurait acquis le transgène et ces microorganismes pathogènes. Des bactéries pathogènes de l'homme, dont l'optimum de température est de 37°C, ont généralement une capacité d'adaptation limitée à l'environnement tellurique.

Par exemple, après deux semaines d'incubation dans le sol, la population d'*E. coli* descend sous le seuil de détection. Beaucoup de ces microorganismes dont le portage est exclusivement humain, comme *M. tuberculosis*, ont donc des temps de résidence limités dans le sol, qu'ils ne colonisent que très transitoirement à la suite de leur inoculation notamment par et dans les crachats des patients. Des études montrent toutefois que *M. bovis* et *M. avium* peuvent persister plus longtemps que *M. tuberculosis* dans l'environnement dans des conditions physico-chimiques particulières à proximité d'animaux infectés (Biet et al., 2005; Humblet et al., 2009; Young et al., 2005). Les bactéries pathogènes trouvent au sein de la communauté bactérienne commensale une source bien plus prolifique de déterminants génétiques conférant la résistance à la kanamycine que les plantes transgéniques. Le réservoir pour de tels gènes est très vaste, comme indiqué plus haut, et ces gènes sont localisés sur des éléments génétiques spécifiquement adaptés à leur dissémination comme des plasmides ou des transposons (*Tn5* notamment) transférables par des mécanismes comme la conjugaison, dont les fréquences de réalisation sont très élevées en comparaison de la transformation qui est le seul mécanisme susceptible de permettre à la bactérie d'acquérir l'ADN de la plante. Concernant le gène *nptII* de ces pétunias, son transfert vers des bactéries saprophytes du sol serait possible mais sans conséquence, puisque l'événement le plus probable consisterait au remplacement d'une copie déjà existante de ce gène. La prévalence naturellement élevée de la résistance à la kanamycine dans les bactéries environnementales et commensales exclurait tout effet délétère si une ou quelques copies supplémentaires venaient à être incorporées dans d'autres régions du génome par recombinaison illégitime et selon une configuration peu probable où le gène, sous système d'expression eucaryote dans la plante, pourrait être exprimé dans la bactérie. De plus, la probabilité que cette bactérie soit un pathogène humain (*M. tuberculosis* notamment) est faible, considérant que ces microorganismes ne sont que des résidents transitoires du sol et qu'un transfert de la copie potentiellement récupérée par une bactérie saprophyte à un pathogène ajoute une étape supplémentaire de transfert, donc baisse encore la fréquence de réalisation. Enfin, les bactéries pathogènes trouvent dans les bactéries commensales, généralement équipées d'éléments génétiques spécialisés pour le transfert d'ADN, une source de gènes de résistance bien mieux fournie et plus accessible que le génome des pétunias.

4.3. Possibilité de transfert de gènes entre plantes transgéniques et bactéries de l'environnement

La possibilité de transfert de gènes entre plantes transgéniques et bactéries de l'environnement a été démontrée au laboratoire sur des modèles d'étude composés de plantes transgéniques variées et de quelques bactéries naturellement transformables utilisées comme réceptrices, principalement *Acinetobacter baylyi* (Gebhard and Smalla, 1998; Kay et al., 2002; Pontiroli et al., 2009; Rizzi et al., 2008).

Les premiers travaux en conditions simulant l'environnement (Kay et al., 2002) montrent qu'une plante soumise à une attaque par un pathogène devient colonisable par d'autres bactéries y compris par des microorganismes capables de développer un stade de compétence et d'acquérir les gènes de la plante. La plante en décomposition (résidusphère) constitue également un écosystème extrêmement favorable à l'acquisition de gènes de la plante GM par les bactéries du sol qui le colonisent (Pontiroli et al., 2009; Rizzi et al., 2008). Comme dans le cas de la plante infectée par un pathogène, la décomposition du matériel végétal contribue à la libération de l'ADN au contact de bactéries métaboliquement très actives du fait des nutriments, ce qui leur permet de développer un stade de compétence.

Un transfert d'ADN réalisé par amorçage de la recombinaison sur les régions de totale similarité entre ADN donneur (transgène) et génome récepteur (bactérien) comme ce pourrait être le cas avec les séquences mentionnées ci-dessus pourrait aboutir potentiellement au co-transfert des régions adjacentes, comprenant les autres séquences du transgène et celles du chromosome de la plante situées près des sites d'intégration du transgène. De tels événements ont en effet été détectés dans le cadre d'études sur un autre couple modèle plante transgénique-bactérie réceptrice par (Gebhard and Smalla, 1998). Les fréquences de tels événements sont extrêmement basses.

Rappelons enfin que de tels événements de transfert de gène, qu'ils concernent les séquences procaryotiques des transgènes ou les régions flanquantes, n'ont jamais été observés « au champ » (Demanèche et al., 2008).

En outre, l'avantage sélectif que de tels événements de transfert pourraient conférer à une bactérie réceptrice, s'ils venaient à se réaliser, serait limité compte tenu des caractéristiques de la construction génétique. Le gène bactérien *nptII* a en effet été cloné dans la plante sous le contrôle d'un promoteur permettant son expression en systèmes eucaryotes sans possibilité d'expression de ce gène dans les bactéries, ce qui limite encore l'impact potentiel s'il venait à être transféré.

Considérons cependant le cas où l'intégration dans le génome d'une bactérie se réaliserait de telle sorte que ce gène puisse effectivement s'y exprimer.

Le gène *nptII* confère une résistance à certains antibiotiques de la famille des aminoglycosides. L'EMA (European Medicines Agency) souligne l'importance des aminoglycosides dans l'arsenal thérapeutique anti-bactérien.

Le gène *nptII* confère la résistance à la kanamycine, la néomycine, la généticine et la paromomycine (Shaw et al, 1993). La néomycine et la paromomycine sont utilisées en application locale, la néomycine sous forme de collyre. La kanamycine est un antibiotique de réserve, utilisé contre les mycobactéries multirésistantes (*i.e.* résistantes à au moins la rifampicine et l'isoniazide). La prévalence de souches de *Mycobacterium tuberculosis* multirésistantes est en augmentation, avec une incidence pouvant atteindre jusqu'à 6,5% des nouveaux cas de tuberculose dans certaines régions du monde (Devaux et al., 2009). Néanmoins, à ce jour, la résistance aux aminoglycosides chez *M. tuberculosis* relève uniquement de mutations altérant leur cible moléculaire (Nair et al., 1993). Il est important de noter que l'activité antibiotique de la gentamicine, aminoglycoside le plus utilisé en clinique humaine, n'est pas affectée par le gène *nptII*.

Le gène *nptII* est ubiquiste dans le monde microbien et il est largement représenté au sein des bactéries commensales du tube digestif de l'homme et des animaux ainsi que dans les échantillons de sol quand ceux-ci sont sous influence anthropique (champs amendés par des fumiers provenant

d'animaux traités, proximité des sites hospitaliers) mais beaucoup moins dans des sols plus « naturels » (Alvarez and Mendoza, 1992; Smalla et al., 1993). Les études de prévalence ont montré la présence de ce gène chez 2,5% des isolats bactériens à Gram négatif résistants à la kanamycine et à la néomycine (Alvarez and Mendoza, 1992). On signalera que la résistance à la kanamycine peut aussi être conférée par le gène *nptI*, mis en évidence chez 90% de ces souches (Alvarez and Mendoza, 1992). Le gène *nptII* a été détecté sur des éléments génétiques mobiles comme le transposon composite *Tn5* et des plasmides responsables de sa dissémination dans le monde bactérien.

4.4. Impact sur l'équilibre populationnel et fonctionnel de la communauté bactérienne

La question finale est de savoir si la présence de bactéries ayant acquis le gène *nptII* à partir de la plante pourrait avoir un impact sur l'équilibre populationnel et fonctionnel de la communauté bactérienne ou en d'autres termes si un avantage adaptatif pourrait être directement associé à cet événement. La fonction codée par ce gène (résistance à des antibiotiques, notamment la kanamycine) ne permet pas de supposer que son acquisition par une bactérie puisse accroître sa valeur adaptative en l'absence des antibiotiques dans l'environnement naturel.

4.5. Conclusion

- Les risques de transfert de gènes de cette plante aux bactéries du sol sont donc extrêmement faibles et les conséquences de tels événements, s'ils venaient à se produire, totalement négligeables pour la santé humaine ou animale et pour l'environnement.

5. Risques sanitaires

5.1. La modification génétique de la couleur de la fleur de pétunia

La couleur des fleurs dépend généralement de la concentration relative de deux pigments que sont les caroténoïdes et les flavonoïdes, ces derniers ayant un rôle prépondérant. Les caroténoïdes sont responsables des couleurs allant du jaune à l'orange. Parmi les flavonoïdes, les anthocyanes sont des pigments colorés répartis en trois groupes : les delphinidines qui produisent généralement la couleur bleue des fleurs, les cyanidines qui produisent la couleur rouge ou rose et les pélagonidines qui produisent les couleurs rouge, orange ou la couleur brique.

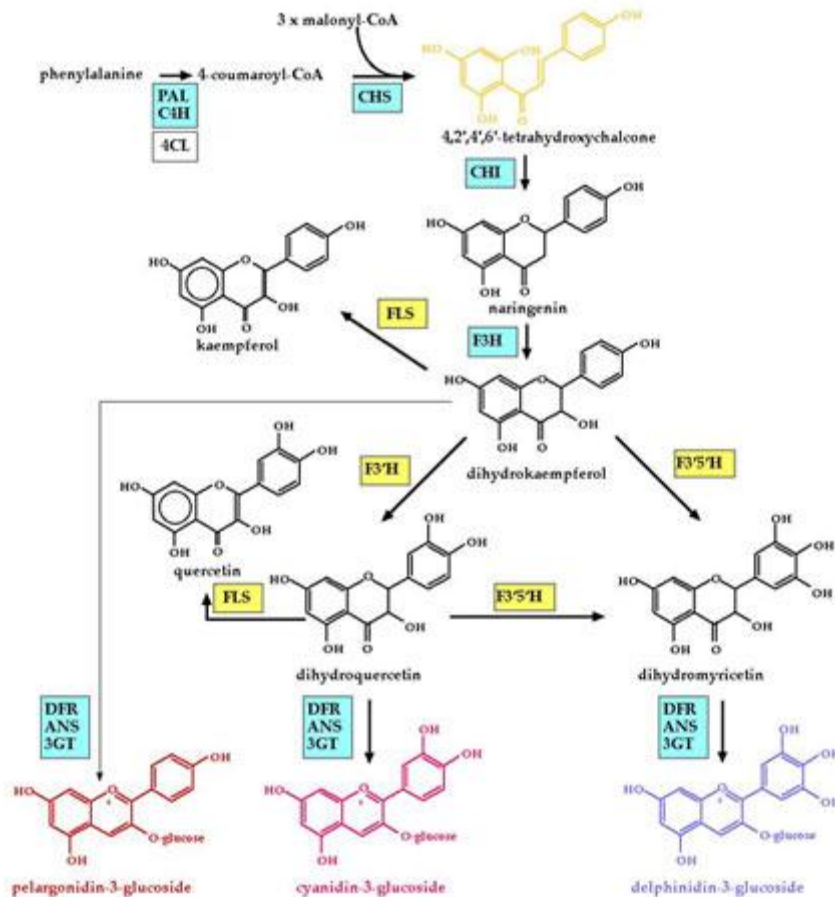


Figure 4 : Voie de biosynthèse des delphinidines (couleur bleue) des cyanidines (couleur rouge ou rose) et des pélagonidines (couleur rouge)

Selon Meyer et al, 1987, la construction génétique à l'origine de l'événement du pétunia génétiquement modifié (*Petunia hybrida*, Lignée RL01-17) provient d'un plasmide p35A1 qui porte deux gènes, l'un codant la dihydroquercitine 4-réductase A1 (DQR) du maïs et l'autre codant la néomycine transférase 2 (*nptII*) utilisé comme marqueur de sélection.

Le gène *A1*, qui code pour une dihydroflavonol réductase, est à l'origine de la transformation du dihydrokaempferol en leucopélagonidine responsable de la couleur rouge saumon de ces plantes GM.

Dans la publication de (Meyer et al., 1987), l'analyse des flavonoïdes montre que cette plante accumule la pélagonidine 3-glucoside, suite à l'activité enzymatique de la DQR sur le dihydrokaempferol (cf fig. 5 ci-dessous).

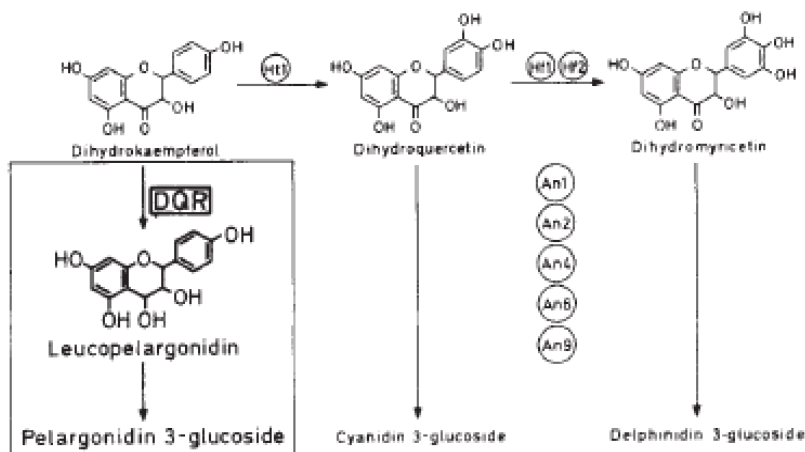


Figure 5 : Accumulation de la pélargonidine 3-glucoside, suite à l'activité enzymatique de la DQR sur le dihydrokaempferol Meyer et al (1985).

5.2. Risques pour la santé animale

S'agissant de fleurs ornementales, la chaîne de distribution est différente de celle des aliments pour animaux.

5.3. Risques pour la santé humaine

Les pétunias sont utilisés à titre ornemental depuis des décennies, sans problème particulier de sécurité pour l'Homme. La modification apportée (production de pélargonidine en tant que pigment) est l'élément nouveau pour ces pétunias, étant entendu que beaucoup d'autres plantes expriment ce type de pigment, également présent dans de nombreux aliments.

Les pétunias ne sont pas connus comme étant des plantes toxiques ou allergisantes et aucune donnée ne fait état d'un risque particulier avec la lignée en question qui bénéficie d'un large historique d'utilisation. Les pétunias n'étant pas destinés à l'alimentation, les risques pour la santé humaine sont d'autant plus limités.

Comme indiqué précédemment, la pélargonidine fait partie avec la cyanidine, la delphinidine mais aussi avec la malvidine, la péonidine et la pétunidine, des principaux anthocyanidols rencontrés dans la nature (Berman et al., 2016; Tanaka et al., 2010).

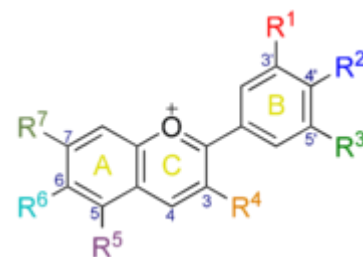
Sur les 539 anthocyanosides recensés par (Andersen and Jordheim, 2010), 94 découlent de la pélargonidine, ce qui en fait l'aglycone de 17 % des anthocyanosides naturels.

Le radis rouge (*Raphanus sativus* L.) contient des quantités significatives d'anthocyanosides issus de la pélargonidine, le glucoside découlant d'un processus d'acylation avec les acides caféique, p-coumarique ou férulique (Otsuki et al., 2002).

La fraise (*Fragaria x ananassa*) est riche en pélargonidine (PHENOL-EX) sous la forme de 3-glucoside de pélargonidine (47,14 mg/100g) ou de ses formes acylées comme la 3-(6-malonylglucoside) de pélargonidine (4,78 mg/100g) ou la 3-(6-succinyl-glucoside) de pélargonidine (10,44 mg/100g) et le 3-rutinoside de pélargonidine (1,32 mg/100g).

La base PHENOL-EXPLORER 3.6⁴ mentionne 11 anthocyanosides majeurs dérivés de la pélagonine présents dans l'alimentation en Europe :

Numérotation du noyau	
Pélagonidine	Fraise (4,31 mg/100g), Haricot (noir)
Pélagonidine 3,5-O-diglucoside	Grenade (<i>Punica granatum</i>), Haricot (noir)
Pélagonidine 3-O-(6-malonyl-glucoside)	Fraise (4,78 mg/100g)
Pélagonidine 3-O-(6-succinyl-glucoside)	Fraise (10,44 mg/10g)
Pélagonidine 3-O-arabinoside	Fraise
Pélagonidine 3-O-glucoside	Fraise (47,14mg/100g), Framboise (1,65 mg/100g, Sureau noir, Grenade ; Haricot noir, cru (12,60 mg/100g)
Pélagonidine 3-O-glucosyl-rutinoside	Framboise
Pélagonidine 3-O-rutinoside	Cassis (2,48 mg/100g), Fraise, Framboise rouge, Cerise douce (<i>Prunus avium</i> L.) (1,24 mg/100g)
Pélagonidine 3-O-sophoroside	Framboise (2,99 mg/100g)



Comme les autres dérivés polyphénoliques (Kong et al., 2003), la pélagonidine possède des propriétés anti-oxydantes (Rice-Evans et al., 1996). La pélagonidine a également été étudiée pour ses effets potentiels anti-inflammatoires et antidiabétiques.

Dans un avis scientifique consacré à un additif alimentaire à base d'anthocyanines (E163)⁵, l'EFSA (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), 2013) précise que leur absorption orale chez le rat est faible (< 1%), ce qui est confirmé chez l'Homme (<2%).

⁴ Phenol-Explorer has been developed at [INRA](#) in collaboration with [AFSSA](#), the [University of Alberta](#), the [University of Barcelona](#), [IARC](#) and [In Siliflo](#). The work has been made possible thanks to the financial support of the French government, the Institut National du Cancer (France), Unilever, Danone and Nestlé

Cet additif a fait l'objet d'évaluation initiale par le Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) en 1982 qui avait conclu à une ADI (Acceptable Daily Intake) de 2,5 mg/kg de poids corporel/j, alors que le Scientific Committee for Food (SCF) ne s'était pas prononcé.

Ce même avis fait état d'études de génotoxicité *in vitro* avec divers composés (delphinidine, cyanidine, malvidine, pelargonidie et peonidine). À des concentrations $\geq 50 \mu\text{M}$ ($\sim 17.5 \text{ g/mL}$), il est observé des augmentations faibles mais significatives de cassures de brins d'ADN sur des cellules HT29. Toutefois, la pélargonidine à des doses $\leq 2 \mu\text{M}$ n'est pas génotoxique sur un test du micronoyau sur des cellules HL-60.

La DL50 per os d'un mélange de 3 anthocyanes (delphinidine, cyanidine et pélargonidine) obtenu après extraction de myrtilles est supérieure à 20 et 25 g/kg de poids corporel respectivement chez le rat et la souris (Pourrat et al., 1967).

La cyanidine est également présente dans d'autres plantes non transgéniques : Petunia (Ando et al., 1999), oeillets (Bloor, 1998), rose (Biolley and Jay, 1993), pomme (Lancaster, 1992), tournesol (Mazza and Gao, 1994), chrysanthèmes (Schwinn et al., 1994), Vesce velue (Catalano et al., 1998) et la vigne (Cacho et al., 1992).

De nombreuses études de toxicité sont rapportées avec des extraits de pellargonium (American Herbal Products Association's Botanical Safety Handbook).

5.4. Allergènes de plantes

Des allergènes d'origine végétale se trouvent dans des aliments et des boissons, ainsi que dans l'atmosphère *via* les pollens et les particules végétales en suspension. Ces allergènes sont le plus souvent, mais pas toujours, des protéines (Mills et al., 2004).

Il a par ailleurs été rapporté que les risques de sensibilisation et d'allergie sont omniprésents avec les plantes ornementales (Engel, 2000), sans que ces dernières n'aient fait l'objet d'études particulières et ne soient proscrites à la vente.

Des risques de sensibilisation cutanée sont rapportés avec des huiles essentielles extraites de pellargonium.

⁵ Contenant divers types d'anthocyanosides sous forme de glucosides : peonidine, malvidine, delphinidine, petunidine, cyanidine..).

5.5. Conclusions

- L'évaluation précise d'un risque supposerait que des données quantitatives relatives à la teneur en pélargonine dans les pétunias génétiquement modifiés soient disponibles.
- Cependant le « *weight of evidence* » qui est recommandé pour juger d'un risque potentiel de toxicité, mais également d'allergénicité (Moneret-Vautrin and Morisset, 2005), conduit le CS du HCB à estimer que les données de la littérature relative à la pélargonine, compte tenu de sa présence dans de nombreux autres végétaux consommés au travers de l'alimentation humaine, ne sont pas de nature à évoquer un danger particulier.

6. Bibliographie

- Alvarez, M., and Mendoza, M.C. (1992). Epidemiological survey of genes encoding aminoglycoside phosphotransferases APH (3') I and APH (3') II using DNA probes. *J. Chemother.* *4*, 203–210.
- Andersen, Ø.M., and Jordheim, M. (2010). Anthocyanins. In *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), p.
- Ando, T., Saito, N., Tatsuzawa, F., Kakefuda, T., Yamakage, K., Ohtani, E., Koshi-ishi, M., Matsusake, Y., Kokubun, H., Watanabe, H., et al. (1999). Floral anthocyanins in wild taxa of *Petunia* (Solanaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* *27*, 623–650.
- Bashandy, H., and Teeri, T.H. (2017). Genetically Engineered Orange Petunias On The Market.
- Berman, J., Sheng, Y., Gomez Gomez, L., Veiga, T., Ni, X., Farr, G., Capell, T., Guitián, J., Guitián, P., Sandmann, G., et al. (2016). Red Anthocyanins and Yellow Carotenoids Form the Color of Orange-Flower Gentian (*Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca*). *PLOS ONE* *11*, e0162410.
- Biet, F., Boschioli, M.L., Thorel, M.F., and Guilloteau, L.A. (2005). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet. Res.* *36*, 411–436.
- Biolley, J.P., and Jay, M. (1993). Anthocyanins in modern roses - chemical and colorimetric features in relation to the color range. *J. Exp. Bot.* *44*, 1725–1734.
- Bloor, S.J. (1998). A macrocyclic anthocyanin from red/mauve carnation flowers. *Phytochemistry* *49*, 225–228.
- BVL (1997). Decision regarding the risk assessment of a deliberate release (field trial) of genetically modified petunia (*Petunia hybrida*) RL01-17, issued by the German Competent Authority.
- Cacho, J., Fernandez, P., Ferreira, V., and Castells, J.E. (1992). Evolutin of 5 anthocyanidin-3-glucosides in the skin of the tempranillo, moristel, and garnacha grape varieties and influence of climatological variables. *Am. J. Enol. Vitic.* *43*, 244–249.
- Catalano, G., Fossen, T., and Andersen, O.M. (1998). Petunidin 3-O-alpha-rhamnopyranoside-5-O-beta-glucopyranoside and other anthocyanins from flowers of *Vicia villosa*. *J. Agric. Food Chem.* *46*, 4568–4570.
- Dell'Olivo, A., Hoballah, M.E., Gübitz, T., and Kuhlemeier, C. (2011). ISOLATION BARRIERS BETWEEN *PETUNIA AXILLARIS* AND *PETUNIA INTEGRIFOLIA* (SOLANACEAE): ISOLATION BARRIERS BETWEEN *PETUNIA AXILLARIS* AND *PETUNIA INTEGRIFOLIA*. *Evolution* *65*, 1979–1991.
- Demanèche, S., Sanguin, H., Pote, J., Navarro, E., Bernillon, D., Mavingui, P., Wildi, W., Vogel, T.M., and Simonet, P. (2008). Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 3957–3962.
- Devaux, I., Kremer, K., Heersma, H., and Van Soolingen, D. (2009). Clusters of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* cases, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* *15*, 1052–1060.
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) (2013). Scientific Opinion on the re-evaluation of anthocyanins (E 163) as a food additive: Re-evaluation of anthocyanins (E 163) as a food additive. *EFSA J.* *11*, 3145.
- Engel, F. (2000). Toxicité cutanée des plantes d'appartements chez l'Homme : aspects moléculaires et mécanistiques. These Doct Pharm. Tours.
- Gargominy, O., Terceire, S., Régnier, C., Ramage, T., Schoelinc, C., Dupont, P., Vandel, E., Daszkiewicz, P., and Poncet, L. TAXREF v9.0, référentiel taxonomique pour la France : méthodologie, mise en oeuvre et diffusion. 126p.

- Gebhard, F., and Smalla, K. (1998). Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* *64*, 1550–1554.
- Gerats, T., and Vandenbussche, M. (2005). A model system for comparative research: *Petunia*. *Trends Plant Sci.* *10*, 251–256.
- Hoballah, M.E., Gubitz, T., Stuurman, J., Broger, L., Barone, M., Mandel, T., Dell’Olivo, A., Arnold, M., and Kuhlemeier, C. (2007). Single Gene-Mediated Shift in Pollinator Attraction in *Petunia*. *PLANT CELL ONLINE* *19*, 779–790.
- Humblet, M.F., Boschioli, M.L., and Saegerman, C. (2009). Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Vet. Res.* *40*, 24.
- Johnson, E.T., Berhow, M.A., and Dowd, P.F. (2008). Colored and White Sectors From Star-Patterned *Petunia* Flowers Display Differential Resistance to Corn Earworm and Cabbage Looper Larvae. *J. Chem. Ecol.* *34*, 757–765.
- Kay, E., Vogel, T.M., Bertolla, F., Nalin, R., and Simonet, P. (2002). In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 3345–3351.
- Klahre, U., Gurba, A., Hermann, K., Saxenhofer, M., Bossolini, E., Guerin, P., and Kuhlemeier, C. (2011). Pollinator Choice in *Petunia* Depends on Two Major Genetic Loci for Floral Scent Production. *Curr. Biol.* *21*, 730–739.
- 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.
- Linn, F., Heidmann, I., Saedler, H., and Meyer, P. (1990). Epigenetic changes in the expression of the maize A1 gene in *Petunia hybrida*: role of numbers of integrated gene copies and state of methylation. *Mol. Gen. Genet. MGG* *222*, 329–336.
- Mazza, G., and Gao, L. (1994). Malonylated anthocyanins in purple sunflower seeds. *Phytochemistry* *35*, 237–239.
- Meyer, P., Heidmann, I., Forkmann, G., and Saedler, H. (1987). A new *petunia* flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* *330*, 677–678.
- Meyer, P., Linn, F., Heidmann, I., Meyer, H., Niedenhof, I., and Saedler, H. (1992). Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize A1 gene construct in transgenic *petunia* and its colour phenotype. *MGG Mol. Gen. Genet.* *231*, 345–352.
- Mills, E.N.C., Jenkins, J.A., Alcocer, M.J.C., and Shewry, P.R. (2004). Structural, biological, and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* *44*, 379–407.
- Moneret-Vautrin, D.A., and Morisset, M. (2005). Adult food allergy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* *5*, 80–85.
- Nair, J., Rouse, D.A., Bai, G.H., and Morris, S.L. (1993). The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* *10*, 521–527.
- Oloumi, H., and Rezanejhad, F. (2009). Response of pollen tube growth and seed set to controlled pollination and their relation to self-incompatibility in different cultivars of *Petunia hybrida*. *Grana* *48*, 102–108.
- Otsuki, T., Matsufuji, H., Takeda, M., Toyoda, M., and Goda, Y. (2002). Acylated anthocyanins from red radish (*Raphanus sativus* L.). *Phytochemistry* *60*, 79–87.

- Oud, J.S.N., Schneiders, H., Kool, A.J., and van Grinsven, M.Q.J.M. (1995). Breeding of transgenic orange *Petunia hybrida* varieties. *Euphytica* *84*, 175–181.
- Pontiroli, A., Rizzi, A., Simonet, P., Daffonchio, D., Vogel, T.M., and Monier, J.-M. (2009). Visual evidence of horizontal gene transfer between plants and bacteria in the phytosphere of transplastomic tobacco. *Appl. Environ. Microbiol.* *75*, 3314–3322.
- Pourrat, H., Bastide, P., Dorier, P., and Tronche, P. (1967). Préparation et activité thérapeutique de quelques glycosides d'anthocyanes. *Chim Thérap* 33–38.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* *20*, 933–956.
- Rizzi, A., Pontiroli, A., Brusetti, L., Borin, S., Sorlini, C., Abruzzese, A., Sacchi, G.A., Vogel, T.M., Simonet, P., Bazzicalupo, M., et al. (2008). Strategy for in situ detection of natural transformation-based horizontal gene transfer events. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 1250–1254.
- Schwinn, K.E., Markham, K.R., and Given, N.K. (1994). Floral flavonoids and the potential for pelargonidin biosynthesis in commercial chrysanthemum cultivars. *Phytochemistry* *35*, 145–150.
- Segatto, A.L.A., Ramos-Fregonezi, A.M.C., Bonatto, S.L., and Freitas, L.B. (2014). Molecular insights into the purple-flowered ancestor of garden petunias. *Am. J. Bot.* *101*, 119–127.
- Sheehan, H., Moser, M., Klahre, U., Esfeld, K., Dell'Olivo, A., Mandel, T., Metzger, S., Vandenbussche, M., Freitas, L., and Kuhlemeier, C. (2015). MYB-FL controls gain and loss of floral UV absorbance, a key trait affecting pollinator preference and reproductive isolation. *Nat. Genet.* *48*, 159–166.
- Smalla, K., Vanoverbeek, L.S., Pukall, R., and Vanelsas, J.D. (1993). Prevalence of nptII and Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* *13*, 47–58.
- Stuurman, J. (2004). Dissection of Floral Pollination Syndromes in *Petunia*. *Genetics* *168*, 1585–1599.
- Tanaka, Y., Brugliera, F., Kalc, G., Senior, M., Dyson, B., Nakamura, N., Katsumoto, Y., and Chandler, S. (2010). Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: practical perspectives. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *74*, 1760–1769.
- Vandenbussche, M., Chambrier, P., Rodrigues Bento, S., and Morel, P. (2016). *Petunia*, Your Next Supermodel? *Front. Plant Sci.* *7*.
- Young, J.S., Gormley, E., and Wellington, E.M.H. (2005). Molecular detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur) in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 1946–1952.

Annexe II. Saisine



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT

Direction générale de
l'alimentation

Service des actions
sanitaires en production
primaire

Sous direction de la
qualité, de la santé et de
la protection des
végétaux

Bureau des semences et
de la protection intégrée
des cultures

251, rue de Vaugirard
75732 Paris cedex 15

Madame Christine NOVILLE
Présidente du Haut conseil des
biotechnologies
à l'attention de Madame Joëlle BUSUTTL
244, boulevard Saint-Germain
75007 PARIS

Paris, le 19 MAI 2017

Objet : saisine du Haut conseil des biotechnologies sur les risques environnementaux liés à la mise sur le marché de pétunias génétiquement modifiés non-autorisés

Références : saisine HCB – pétunias

Affaire suivie par : Anne Grevet

tél. : 01 49 55 58 25 fax : 01 49 55 59 49

courriel : anne.grevet@agriculture.gouv.fr

Madame la Présidente,

Les autorités françaises ont été informées par la Commission européenne de la mise sur le marché illégale de pétunias génétiquement modifiés dans l'Union européenne, suite à un signalement de la Finlande. Ces pétunias se caractérisent par la couleur orange de leurs fleurs. Ils ne sont pas autorisés à la mise sur le marché dans l'Union européenne.

Les résultats d'analyses obtenus par la Finlande suggèrent que ces pétunias correspondent à l'OGM décrit dans la publication Meyer et al. (1987)¹.

Cet OGM a par ailleurs fait l'objet d'un essai au champ en Allemagne en 1997, pour lequel des informations sont disponibles sur le site suivant : <https://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=111614>.

Les premières enquêtes conduites par la DGAL montrent que les pétunias génétiquement modifiés ont fait l'objet d'une commercialisation en France.

Une procédure de retrait de la mise sur le marché des pétunias orange a été établie par la DGAL en concertation avec les représentants professionnels.

Dans ce contexte, j'ai l'honneur de vous demander, par la présente saisine, de bien vouloir procéder en urgence à une analyse des risques pour la santé humaine (liés à une possible consommation) et des risques environnementaux liés à la mise sur le marché en France de ces pétunias génétiquement modifiés, sur la base des informations disponibles, pour le 15 juin 2017.

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

Bi - 2017

Le Directeur Général de l'Alimentation,
Philippe DEHAUMONT

¹ Meyer et al. (1987) A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. Letters to Nature 330 : 677-678

Annexe III. Liste des membres du Comité scientifique

Cet avis a été élaboré par le CS du HCB à partir de la discussion de rapports d'expertise et d'un projet d'avis en séance du 22 juin 2017⁶ sous la présidence du Dr Jean-Christophe Pagès et la vice-présidence du Dr Pascal Boireau et du Dr Claudine Franche.

Le CS du HCB est un comité pluridisciplinaire composé de personnalités scientifiques nommées par décret au titre de leur spécialité en relation avec les missions du HCB.

Par ordre alphabétique des noms de famille, le CS du HCB est composé de :

Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno Chauvel, Cécile Collonnier, Denis Couvet, Elie Dassa, Hubert De Verneuil, Barbara Demeinex, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Jamal Khalife, Bernard Kloujowski, Marc Lavielle, Valérie Le Corre, François Lefèvre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Eliane Meurs, Nadia Naffakh, Didier Nègre, Jean-Louis Noyer, Sergio Ochatt, Jean-Christophe Pagès, Xavier Raynaud, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Tristan Renault, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.

Le dossier a été examiné par 5 experts rapporteurs sélectionnés parmi les membres du CS pour leurs compétences dans les disciplines requises pour l'analyse du dossier.

Les membres du CS du HCB remplissent annuellement une déclaration publique d'intérêts. Ils sont également interrogés sur l'existence d'éventuels conflits d'intérêts avant l'examen de chaque dossier.

Aucun membre du CS n'a déclaré avoir de conflits d'intérêts qui auraient pu interférer avec l'élaboration de cet avis.

⁶ Membres du CS présents et représentés lors de la discussion du projet d'avis en séance du 22 juin 2017 : Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Pascal Boireau, Cécile Collonnier, Denis Couvet, Barbara Demeinex, Hubert De Verneuil, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Jamal Khalife, Bernard Kloujowski, Valérie Le Corre, François Lefèvre, Olivier Lemaire, Rémi Maximilien, Eliane Meurs, Nadia Naffakh, Jean-Christophe Pagès, Xavier Raynaud, Michel Renard, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.