



HAL
open science

Avis en réponse à la saisine HCB - dossier C/NL/04/02_001. Paris, le 13 mars 2017

Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Philippe Berny, Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno B. Chauvel, Denis Couvet, Elie Dassa, Hubert de Verneuil, et al.

► To cite this version:

Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Philippe Berny, Pascal Boireau, et al.. Avis en réponse à la saisine HCB - dossier C/NL/04/02_001. Paris, le 13 mars 2017. [0] Haut conseil des biotechnologies. 2017. hal-02789356

HAL Id: hal-02789356

<https://hal.inrae.fr/hal-02789356v1>

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 - ShareAlike 4.0 International License

COMITÉ SCIENTIFIQUE

AVIS

en réponse à la saisine HCB – dossier C/NL/04/02_001¹.

Paris, le 13 mars 2017

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 12 janvier 2017 par les autorités compétentes françaises (le ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt) d'une demande d'avis relative au dossier **C/NL/04/02_001** de demande de renouvellement d'autorisation de mise sur le marché d'œillets génétiquement modifiés **FLO-40644-6** à des fins d'importation et de commercialisation de fleurs coupées.

Ce dossier a été déposé par la société **Suntory Flowers Limited**, Tokyo, Japan (anciennement Florigene) auprès des autorités compétentes néerlandaises sur le fondement de la directive 2001/18/CE.

Conformément à cette directive, la Commission européenne a adressé le rapport d'évaluation des Pays-Bas ainsi que le dossier du pétitionnaire à l'ensemble des Etats membres, qui ont déjà disposé de 60 jours pour faire des commentaires, demander des informations complémentaires ou émettre des objections à la mise sur le marché (période de consultation allant jusqu'au 28 octobre 2016). Les autorités françaises ont émis une objection de principe à la mise sur le marché de cet OGM auprès de la Commission européenne dans l'attente de l'évaluation du dossier par le HCB.

Par cette saisine, les autorités compétentes françaises consultent le HCB afin de motiver ou d'actualiser leur position sur la mise sur le marché de l'OGM auprès de la Commission européenne.

Le Comité scientifique (CS)² du HCB a examiné le dossier en séance du 23 février 2017 sous la présidence de Jean-Christophe Pagès. Le présent avis a été adopté par voie électronique le 13 mars 2017 et publié le 15 mars 2017.

¹ La saisine HCB – dossier C/NL/04/02_001 est reproduite dans l'Annexe 1.

² Les modalités de l'élaboration de l'avis et la composition du CS sont indiquées dans l'Annexe 2.

RESUME DE L'AVIS³

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi d'une demande d'avis relative au dossier C/NL/04/02_001 dans le but d'éclairer les autorités compétentes françaises, à la suite de leur objection de principe à la mise sur le marché de cet OGM auprès de la Commission européenne dans l'attente de l'évaluation du dossier par le HCB. Déposé par la société Suntory Flowers Limited, Tokyo, Japan (anciennement Florigene) auprès des autorités compétentes néerlandaises sur le fondement de la directive 2001/18/CE, ce dossier est une demande de renouvellement d'autorisation de mise sur le marché d'œillets génétiquement modifiés FLO-40644-6 à des fins d'importation et de commercialisation de fleurs coupées dans l'Union européenne.

Description du produit

La lignée d'œillets 123.2.38 (Événement Florigene Moonlite™ FLO-40644-6) est modifiée génétiquement par introduction de deux gènes de pétunia, *dfr* et *f3'5'h*, impliqués dans la voie de biosynthèse des anthocyanes. Leur expression confère aux fleurs une coloration violette résultant de l'accumulation de delphinidine. Cette lignée exprime également le gène muté *SuRB* (*als*) d'acétolactate synthase de *Nicotiana tabacum* conférant une tolérance aux herbicides de la famille des sulfonilurées, utilisée uniquement pour la sélection des transformants primaires. La transformation génétique a été réalisée à l'aide la souche désarmée d'*Agrobacterium tumefaciens* AGLO contenant les cassettes d'expression au sein de l'ADN-T du plasmide pCGP1470. Les analyses initiales du dossier datant de 2006 ont montré l'insertion de deux copies de l'ADN-T en des sites différents du génome des plantes hôtes. La première copie exprime l'ensemble des gènes transférés et comporte un fragment du plasmide vecteur situé à l'extérieur de la bordure gauche de l'ADN-T. La seconde copie contient un ADN-T incomplet, comprenant un fragment tronqué du gène *dfr* et de son terminateur.

Grâce à la séquence d'un génome d'œillet publiée en 2014, les deux loci d'insertion ont pu être situés sur deux fragments génomiques (« scaffolds ») différents. Aucune séquence codante n'est interrompue par les insertions. Le caractère de coloration est stable dans les fleurs produites depuis 1998 par bouturages successifs.

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 évalué la toxicité ainsi que le potentiel allergénique de la lignée 123.2.38.

La delphinidine existe naturellement dans beaucoup d'autres plantes et fruits comestibles (myrtilles, mûres), elle n'est pas connue pour être toxique ou allergène.

L'acétolactate synthase (ALS) est une enzyme présente dans les plantes, les bactéries et les champignons. La forme mutée du gène de l'ALS du tabac (*SuRB*) présente dans la lignée d'œillets 123.2.38 n'est pas associée à un risque sanitaire particulier.

Dans la demande de renouvellement, une analyse complémentaire des ORF potentiellement créés à la jonction des deux sites d'insertion a été réalisée. Les analyses bioinformatiques datant de 2016 indiquent l'absence d'homologie avec des allergènes ou des toxines.

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

Risques de dispersion et impact sur l'environnement

Les risques potentiels pour l'environnement concernent les risques de dispersion des transgènes et leurs conséquences.

Suite à la mise sur le marché de fleurs coupées d'œillets génétiquement modifiés, les transgènes qu'ils portent pourraient théoriquement être dispersés suite à une multiplication végétative, une dispersion de pollen vers d'autres œillets ou espèces apparentées, ou une dispersion de graines qui se seraient développées sur les fleurs coupées. En pratique :

- une multiplication végétative serait impossible naturellement à partir de fleurs coupées ; elle serait difficile mais possible par des techniques de bouturage spécifiques appliquées par des individus expérimentés ;
- une dispersion de pollen vers d'autres œillets ou espèces apparentées serait peu probable compte tenu : (1) de l'environnement dans lequel les fleurs coupées sont placées (essentiellement des habitations), (2) de la relative faiblesse de la production de pollen des œillets cultivés comparée à celle des œillets « sauvages », (3) du caractère uniquement entomophile de la pollinisation (principalement via des lépidoptères, qui n'ont pas un comportement de butinage optimal), 4) de la faible 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 et des conditions de conservation des fleurs coupées, et (6) de la distance de dispersion relativement courte (quelques centaines de mètres).
- une dispersion de graines qui se seraient développées sur les fleurs coupées serait très improbable considérant notamment que le processus de développement des graines dure cinq semaines à deux mois et qu'une fleur coupée en vase ne survit pas sur cette durée.

Par ailleurs, dans le cas peu probable d'une dispersion dans l'environnement, des plantes porteuses du transgène *SurB* ne présenteraient pas d'avantage sélectif, sauf dans le cas particulier où elles seraient exposées à des herbicides dont la seule matière active est le flazasulfuron.

L'évaluation phénotypique comparative présentée dans le dossier de renouvellement ne met pas en évidence de risque accru de dispersion par reproduction sexuée et flux de gènes.

Le CS du HCB recommande cependant, que, si elle était autorisée, la mise sur le marché des œillets FLO-40644-6 soit accompagnée de mesures propres à répondre au risque de dispersion par bouturage par une communication à l'attention des sociétés d'amateurs quant aux possibilités de diffusion non contrôlée des œillets transgéniques.

Plans de surveillance post-commercialisation

Considérant les résultats de l'analyse de risques et l'utilisation prévue des œillets dans la demande d'autorisation de mise sur le marché C/NL/04/02, le CS du HCB s'accorde avec le pétitionnaire sur le fait qu'un plan de surveillance spécifique n'est pas nécessaire.

Le CS du HCB approuve l'approche générale et les méthodes du plan de surveillance générale indiquées par le pétitionnaire en accord avec la directive 2001/18/CE. Il inclut l'étiquetage spécifique des fleurs, la constitution de réseaux d'experts, une surveillance des populations de *Dianthus* sauvages à travers des institutions spécialisées, et une veille documentaire et bibliographique.

Il n'apparaît pas utile de prolonger la surveillance post-commercialisation au-delà de la période couverte par l'autorisation, sachant que la surveillance générale réalisée sur une période de 10 ans n'a montré aucun effet adverse pour la santé humaine et animale ou l'environnement.

Pour améliorer la surveillance de terrain sur les espèces endémiques de *Dianthus* en France, des experts français du secteur public ou privé, comme par exemple des experts de conservatoires botaniques, devraient être incités par les autorités compétentes à se rapprocher du pétitionnaire pour conduire avec lui la veille de terrain qu'il souhaite réaliser et qui contribue à faire progresser la connaissance scientifique.

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 identifié suite à l'évaluation et l'analyse bioinformatique de lignée d'œillets 123.2.38 (Événement Florigene Moonlite™ FLO-40644-6), de la delphinidine, de l'enzyme mutante ALS, ou des ORFs potentiels créés par la modification génétique.
- Il est improbable que les fleurs coupées d'œillet produisent des graines ; le risque de dispersion par des graines produites par ces fleurs est donc quasi nul.
- Le risque de dispersion de gènes par le pollen de fleurs coupées d'œillet est faible mais non nul. Il ne lui serait cependant pas associé d'impact environnemental significatif.
- La dispersion par bouturage est difficile à réaliser mais possible par des techniques adaptées. Le CS du HCB recommande que, si elle était autorisée, la mise sur le marché des œillets FLO-40644-6 soit accompagnée de mesures propres à répondre au risque de dispersion par bouturage par une communication à l'attention des sociétés d'amateurs quant aux possibilités de diffusion non contrôlée des œillets transgéniques.
- Le plan de surveillance proposé par le pétitionnaire est adapté à l'utilisation prévue des œillets Florigene Moonlite™ FLO-40644-6 dans la demande d'autorisation de renouvellement de mise sur le marché. Le CS du HCB considère qu'il n'apparaît pas utile de prolonger la surveillance post-commercialisation au-delà de la période couverte par l'autorisation, sachant que la surveillance générale réalisée sur une période de 10 ans n'a montré aucun effet adverse pour la santé humaine et animale ou l'environnement.
- Pour améliorer la surveillance de terrain sur les espèces endémiques de *Dianthus* en France, des experts français du secteur public ou privé, comme par exemple des experts de conservatoires botaniques, devraient être incités par les Autorités compétentes à se rapprocher du pétitionnaire pour conduire avec lui la veille de terrain qu'il souhaite réaliser et qui contribue à faire progresser la connaissance scientifique. De plus, afin de vérifier le bon fonctionnement de la surveillance générale, il pourrait être envisagé de s'assurer de la puissance du dispositif et de la robustesse de la surveillance, ceci par une collaboration entre le pétitionnaire et les autorités compétentes des Etats membres ou d'autres organisations.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	6
1.1. CONTEXTE RÉGLEMENTAIRE DE LA SAISINE	6
1.2. HISTORIQUE DU DOSSIER.....	6
2. CARACTÉRISTIQUES DES PLANTES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉES	7
2.1. DESCRIPTION DU PRODUIT.....	7
2.2. CARACTÉRISTIQUES DE LA CONSTRUCTION GÉNÉTIQUE.....	7
2.3. MÉTHODE DE TRANSFORMATION.....	8
2.4. CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DES CÉILLETS FLO-40644-6 ET ACTUALISATION DES DONNÉES	9
3. EVALUATION DES RISQUES POUR LA SANTÉ HUMAINE ET ANIMALE	12
- ANALYSE DE LA TOXICITE ET DE L'ALLERGENICITE DES CÉILLETS	12
- EVALUATION DES RISQUES POTENTIELS ASSOCIES A LA DELPHINIDINE	12
- EVALUATION DES RISQUES POTENTIELS ASSOCIES A L'ACETOLACTATE SYNTHASE MUTANTE	13
- EVALUATION DES RISQUES POTENTIELS ASSOCIES AUX ORF PUTATIFS	13
4. EVALUATION DES RISQUES POUR L'ENVIRONNEMENT	14
4.1. RISQUES POTENTIELS DE DISPERSION	14
- Dispersion potentielle des transgènes par bouturage	15
- Dispersion potentielle des transgènes par le pollen ou les graines.....	16
4.2. AVANTAGE SÉLECTIF ÉVENTUEL ASSOCIÉ À LA TOLÉRANCE À CERTAINS HERBICIDES	17
5. PLAN DE SURVEILLANCE POST-COMMERCIALISATION	18
6. CONCLUSIONS	19
7. BIBLIOGRAPHIE	20
ANNEXE 1 : SAISINE	22
ANNEXE 2 : ELABORATION DE L'AVIS.....	23

1. Introduction

1.1. Contexte réglementaire de la saisine

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 12 janvier 2017 par les autorités compétentes françaises (le ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt) d'une demande d'avis relative au dossier C/NL/04/02_001 de demande de renouvellement d'autorisation de mise sur le marché d'œillets génétiquement modifiés FLO-40644-6 à des fins d'importation et de commercialisation de fleurs coupées.

Ce dossier a été déposé par la société Suntory Flowers Limited, Tokyo, Japan (anciennement Florigene) auprès des autorités compétentes néerlandaises sur le fondement du règlement (CE) n° 2001/18/CE.

Conformément à cette directive, la Commission européenne a adressé le rapport d'évaluation des Pays-Bas ainsi que le dossier du pétitionnaire à l'ensemble des Etats membres, qui ont déjà disposé de 60 jours pour faire des commentaires, demander des informations complémentaires ou émettre des objections à la mise sur le marché (consultation ouverte jusqu'au 28 octobre 2016). La formulation ou non d'objections par les différents Etats membres détermine la suite de la procédure.

En l'occurrence, les autorités françaises ont émis une objection de principe à la mise sur le marché de cet OGM auprès de la Commission européenne dans l'attente de l'évaluation du dossier par le HCB.

Par cette saisine, les autorités compétentes françaises consultent le HCB afin de motiver ou d'actualiser leur position sur la mise sur le marché de l'OGM auprès de la Commission européenne.

Les autorisations accordées en vertu de la directive 2001/18/CE sont renouvelables pour des périodes de dix ans maximum, et doivent être adressées à l'autorité compétente de l'Etat membre où l'OGM a été mis sur le marché pour la première fois, et ce, par le titulaire de l'autorisation au plus tard 9 mois avant la date d'expiration. La demande de renouvellement doit comporter les éléments suivants :

- une copie de l'autorisation de mise sur le marché de l'OGM ;
- un rapport sur les résultats de la surveillance effectuée ;
- toute information nouvelle qui serait disponible en ce qui concerne les risques du produit pour la santé humaine et/ou l'environnement ;
- s'il y a lieu, une proposition visant à modifier ou à compléter les conditions de l'autorisation initiale, c'est-à-dire les conditions relatives à la surveillance future et à la durée de validité de l'autorisation.

1.2. Historique du dossier

La lignée d'œillets 123.2.38 (Evénement Florigene Moonlite™ **FLO-40644-6**) a été autorisée à des fins d'importation et de commercialisation de fleurs coupées le 11 juillet 2007 pour une durée de dix ans. L'autorisation actuelle prend donc fin le 11 juillet 2017. La demande de renouvellement a été faite en date du 23 mai 2016, et a été reçue par l'autorité compétente néerlandaise le 25 mai 2016, soit plus de 9 mois avant la date d'expiration de l'autorisation actuelle, conformément à l'article 17(2) de la directive 2001/18/CE.

Le présent dossier est une demande de renouvellement d'autorisation de mise sur le marché d'œillets génétiquement modifiés FLO-40644-6 à des fins d'importation et de commercialisation

de fleurs coupées. La présente demande exclut la culture (ainsi que la consommation animale et humaine).

2. Caractéristiques des plantes génétiquement modifiées

2.1. Description du produit

La lignée d'œillets 123.2.38 (événement FLO-40644-6 préalablement référencée FLO-40644-4 ; nom commercial : Florigene Moonlite™ 123.2.38) résulte de la transformation génétique par *Agrobacterium tumefaciens* de la lignée *Dianthus caryophyllus* L. 123 à fleurs blanches. Elle exprime deux gènes de pétunia impliqués dans la voie de biosynthèse des anthocyanes, le gène de la dihydroflavonol 4-réductase (*dfr*) et celui des flavonoïdes, la 3'-5'-hydroxylase (*f3'5'h*) conférant aux fleurs une coloration violette (Figure 1), ainsi que le gène muté *SuRB* (*als*) d'acétolactate synthase de *Nicotiana tabacum* conférant une tolérance 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), enzyme absente chez les œillets, qui assure par ailleurs l'hydroxylation des composés DHK et DHQ en DHM.

L'œillet non transgénique est dépourvu du gène qui code l'enzyme F3'5'H. L'expression des transgènes *dfr* et *f3'5'h*, et celle des gènes de la voie de biosynthèse des anthocyanes déjà présents dans l'œillet 123, permettent l'accumulation de delphinidine dans la lignée 123.2.38.



Figure 1 :

Photos de l'œillet transgénique Florigene Moonlite™ (extraite dossier CNL 04 02, 1. Monitoring reports CNL0402 2008-2015.pdf, page 17)

2.2. Caractéristiques de la construction génétique

La construction génétique à l'origine de l'événement FLO-40644-6 est portée par le plasmide pCGP1470 (25587 pb) (Figure 2). Il porte, à l'extérieur de l'ADN-T, 1.5 kb du plasmide pACYC184 d'*Escherichia coli* permettant la répllication du plasmide dans cette bactérie ; 8 kb d'ADN

plasmidique de *Pseudomonas aeruginosa* assurant la réplication dans *Agrobacterium tumefaciens* ; et 2 kb du complexe de gènes *tet* comprenant les séquences *tet(A)* et *tet(R)* d'*E. coli* conférant une résistance à la tétracycline et permettant la sélection des bactéries transformées par le vecteur.

Le vecteur contient, entre les séquences bordures gauche (LB) et droite (RB) de l'ADN-T (12292 pb), trois cassettes d'expression.

- La première cassette permet l'expression du gène muté *SuRB (als)* de *Nicotiana tabacum*, conférant une tolérance aux herbicides de la famille des sulfonylurées. L'expression de ce gène est sous le contrôle du promoteur constitutif 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur et de son propre terminateur de transcription. Une région de 60 pb, correspondant à la région 5' non-codante du gène *Cab* de *Petunia x hybrida*, codant une protéine de fixation à la chlorophylle a/b, est présente en amont du gène afin d'optimiser son expression *in vivo*.
- La seconde cassette porte la séquence codante de flavonoïde 3'-5'-hydroxylase (*f3'5'h*) de *Petunia x hybrida*, placée sous le contrôle du promoteur de chalcone synthase (CHS) d'*Antirrhinum majus* (mufler) et du terminateur de transcription du gène *D8* (séquence homologue à un gène codant une protéine de transfert de phospholipides) de *Petunia x hybrida*.
- La troisième cassette permet l'expression de la séquence codante de la dihydroflavonol 4-réductase (*dfr*) de *Petunia x hybrida*. Son expression est dirigée par le promoteur constitutif *Mac*, composé de la région 5' du promoteur 35S dont la boîte TATA est remplacée par celle du promoteur de la mannopine synthase (*mas*) d'*A. tumefaciens*, et suivie de 300 pb de ce même promoteur. La séquence de terminaison *tmas* du gène de la mannopine synthase d'*A. tumefaciens* assure la fin de la transcription.

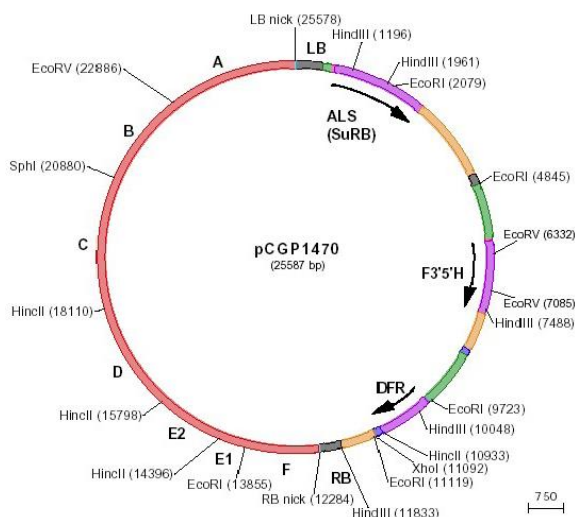


Figure 2 :
 Carte du plasmide pCGP1470 (dossier CNL 04 02, attachement 8, Figure 1). Les lettres A à F font référence aux sondes utilisées pour démontrer l'absence de vecteur dans les œillets 123.2.38 (paragraphe 2.4).

2.3. Méthode de transformation

La lignée d'œillet 123.2.38 a été obtenue par transformation génétique de la lignée d'œillet 123 (Cream Cinderella), à l'aide de la souche désarmée d'*Agrobacterium tumefaciens* AGLO portant le vecteur de transformation pCGP1470. Les transformants primaires ont été sélectionnés grâce à l'expression du gène *SuRB (als)* conférant la tolérance à l'herbicide chlorsulfuron. Les agrobactéries ont été éliminées par un traitement à la ticarcilline ; leur élimination a été étudiée

sur des fragments de tige d'œillets et démontrée par l'absence d'amplification PCR du gène de virulence *virG* situé sur le plasmide Ti, à l'extérieur de l'ADN-T.

2.4. Caractérisation moléculaire des œillets FLO-40644-6 et actualisation des données

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

Le nombre de sites d'insertion a été déterminé par des expériences d'hybridation moléculaire de type Southern. L'ADN génomique a été extrait de pétales d'œillets FLO-40644-6 et de leurs homologues non transgéniques, puis digéré par *EcoRI* ou *BglII*. Les résultats des hybridations réalisées avec 12 sondes couvrant l'intégralité du plasmide pCGP1470 (Figure 2) ont mis en évidence en 2006 la présence de deux sites d'insertion de l'ADN-T dans la lignée 123.2.38.

Dans le premier site d'insertion, une copie complète de l'ADN-T est présente ; des bandes d'hybridation sont également observées avec une sonde située à l'extérieur de l'ADN-T (sonde A, Figure 3), indiquant un transfert d'ADN d'une région du plasmide vecteur pCGP1470 extérieure à l'ADN-T. Dans cette région du vecteur est située la séquence *tet(A)* d'*E. coli* (Figure 3). Aucune hybridation n'a été obtenue avec la sonde B qui couvre la totalité de la séquence *tet(R)*.

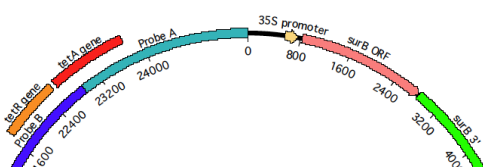


Figure 3 :

Localisation des gènes *tet(A)* et *tet(R)* et de la sonde A sur le vecteur pCGP1470 (dossier CNL 04 02, attachment 7, Figure 1)

Dans le second site d'insertion, une copie partielle de l'ADN-T est présente, comprenant le gène *dfr* et une copie de la séquence RB correspondant à la bordure droite de l'ADN-T. Aucune hybridation n'est observée avec les sondes correspondant à la partie du vecteur extérieure à l'ADN-T.

- Séquençage des inserts et des régions flanquantes

Les deux inserts ont été séquencés en 2006, permettant de préciser les réarrangements consécutifs au transfert d'ADN-T (Figure 3).

Le **locus 1** (14585 pb) comprend l'ensemble des séquences présentes au sein de l'ADN-T, ainsi que 484 pb de la séquence correspondant à la bordure gauche (LB) de l'ADN-T, 1352 pb de la séquence pACYC184 d'*E. coli* et 190 pb correspondant à la partie 3' du gène (*tetA*), soit une séquence correspondant à moins de 20% de ce gène (Figure 4).

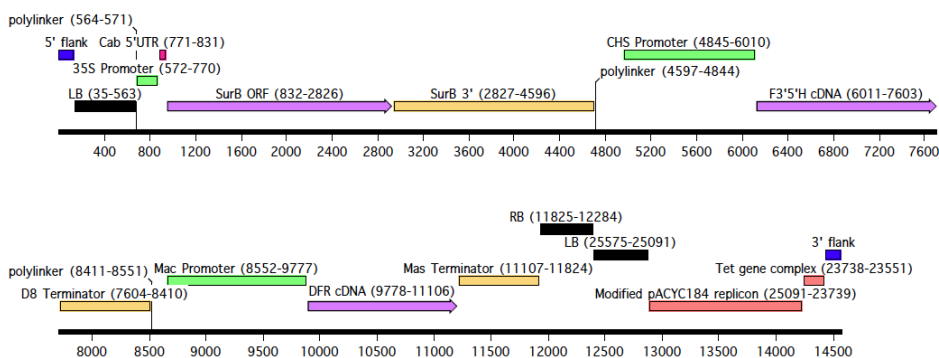


Figure 4 :
Représentation schématique de l'insert présent dans le locus 1 de la lignée 123.2.38. (dossier CNL 04 02, attachment 2)

Le **locus 2** (2204 pb) correspond à un ADN-T tronqué se composant d'une copie du gène *dfr* déléetée de 578 pb de la partie codante située 5' (la taille initiale du gène est 1328 pb), du terminateur *Mas* et de 425 pb de la séquence située dans la bordure droite de l'ADN-T (Figure 5).

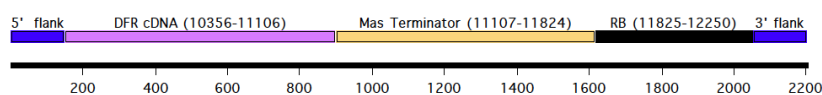


Figure 5 :
Représentation schématique de l'insert présent dans le locus 2 de la lignée 123.2.38 (dossier CNL 04 02, attachment 2)

La lignée 123.2.38 porte donc une copie des gènes *SuRB* et *f3'5'h*, deux copies du gène *dfr* (dont une tronquée), deux copies des séquences flanquantes LB et RB, et un fragment du vecteur de transformation comprenant une délétion du gène *tet(A)*.

Dans le dossier datant d'avril 2006, 150 pb correspondant aux régions flanquantes situées en 5' et 3' de chacun des deux loci d'insertion ont été séquencées. Un séquençage plus étendu des régions flanquantes n'a pas été réalisé pour le dossier de renouvellement de mai 2016.

La séquence d'un génome d'œillet (*Dianthus caryophyllus* L. cv. 'Francesco') a été publiée en 2014 (Yagi et al., 2014). L'interrogation des bases de données correspondantes a permis de préciser, en utilisant les séquences de 150 pb des régions flanquantes, que le locus 1 d'insertion est localisé dans le scaffold 3618 (fragment génomique) et le locus 2 est situé dans le scaffold 8. La séquence codante la plus proche du locus 1 d'insertion présente des homologies avec un gène d'adénosine désaminase d'*Arabidopsis thaliana*. Les gènes les plus proches du locus 2 d'insertion présentent des homologies avec un gène de vigne codant une protéine non caractérisée.

Les nouvelles analyses bioinformatiques mettent en évidence que les deux insertions ne sont pas situées dans des régions codantes du génome nucléaire.

- Expression des transgènes et quantification des protéines

L'expression des trois transgènes *SuRB* (*als*), *dfr* et *f3'5'h* a été étudiée par des analyses de type northern. Les ARN totaux ont été extraits de pétales des œillets transgéniques et leurs homologues non transgéniques, puis hybridés avec les sondes *SuRB* (*als*), *dfr* et *f3'5'h*. Des bandes d'hybridation sont observées uniquement sur les ARN de la lignée 123.2.38. Les niveaux d'expression de ces gènes n'ont pas été quantifiés.

Des quantifications de delphinidine et de cyanidine ont été réalisées par chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC). Les concentrations de delphinidine et de cyanidine mesurées dans les pétales des œillets FLO-40644-6 sont respectivement de 0,093 et 0,031 mg.g⁻¹

de poids frais ; elles sont égales à 0 dans les pétales de la lignée témoin 123. Le niveau de delphinidine dans les œillets transgéniques est comparable, voir inférieur, à celui mesuré dans des plantes ornementales telle que l'agapanthe (0,12 mg.g⁻¹ de poids frais) ou dans des fruits tels que le cassis (1,25 mg.g⁻¹ de poids frais).

La présence de delphinidine n'a été observée que dans les pétales des œillets transgéniques. Elle n'est pas détectée dans les tiges, nœuds, feuilles et racines. Cette spécificité d'expression est le résultat d'une part de promoteurs spécifiques des pétales dirigeant l'expression de certains gènes nécessaires à cette synthèse, et d'autre part de la biosynthèse des anthocyanes qui coïncide avec le développement des fleurs.

La concentration en ALS n'a pas été déterminée. La présence d'ARN messager et la possibilité d'effectuer une sélection des transformants primaires d'œillets à l'aide de l'herbicide chlorsulfuron indiquent l'expression du gène *SuBR (als)* et la synthèse d'une protéine fonctionnelle.

Afin de déterminer si le gène *tet(A)* délété peut conférer aux œillets transgéniques une résistance à la tétracycline, une construction permettant l'expression dans les bactéries de la séquence *tet(A)* délétée a été réalisée, puis introduite dans la souche d'*E. coli* DH5 α . Aucune bactérie transformée ne pousse en présence de tétracycline, quelle que soit la concentration d'antibiotique utilisée (0,5 à 12,5 μ g.mL⁻¹). Ces résultats indiquent que le fragment tronqué du gène *tet(A)* ne confère pas une résistance à la tétracycline à la lignée d'œillets 123.2.38.

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

Les fleurs coupées sont prélevées sur des plantes issues de bouturages successifs des transformants primaires. Les œillets transgéniques de la lignée 123.2.38 ne seront pas utilisés dans des croisements avec d'autres cultivars d'œillets dans le cadre de cette demande. La question de l'héritabilité mendélienne des transgènes n'a donc pas été abordée.

La stabilité des transgènes a été déduite du maintien de la couleur violette des fleurs. La lignée 123.2.38 est multipliée par bouturages successifs depuis 1998. En 2004, après des millions de fleurs produites sur 7 générations de pieds mères, aucune altération de la couleur des fleurs n'est signalée dans le dossier de 2006.

En mars 2016, le nombre de fleurs importées en Europe depuis l'autorisation de commercialisation a été estimé à 13 millions. La fréquence d'apparition de fleurs « off-types », ayant une couleur rose au lieu de la coloration violette attendue, a été étudiée en 2011 en Colombie, à partir de douze échantillons comprenant chacun au moins 1300 fleurs. Les résultats indiquent une fréquence d'apparition de la couleur rose comprise entre 0 et 0,4% des fleurs, avec une valeur moyenne de 0,2%.

L'analyse moléculaire met donc en évidence la présence de deux sites d'insertion dans le génome des œillets FLO-40644-6. Le locus 1 comporte l'ensemble des trois cassettes permettant l'expression des gènes *dfr*, *f3'5'h* et *SuRB*, ainsi qu'une séquence du vecteur comportant un fragment du gène *tet(A)*. Celui-ci ne suffit pas à conférer une résistance à l'antibiotique tétracycline. Le locus 2 porte un fragment comprenant une séquence tronquée du gène *dfr*, son terminateur et la bordure RB.

Dans le dossier datant d'avril 2006, 150 pb correspondant aux régions flanquantes situées en 5' et 3' de chacun des deux loci d'insertion ont été séquencées. Un séquençage plus étendu des régions flanquantes n'a pas été réalisé pour le dossier de renouvellement de mai 2016.

Depuis 1998, la coloration conférée dans les pétales par l'expression des gènes *dfr* et *f3'5'h* de pétunia est stable dans le temps, la fréquence d'apparition de fleurs ayant une pigmentation modifiée étant en moyenne de 0,2%. Grâce à la séquence d'un génome d'œillet publiée en 2014, les deux loci d'insertion ont pu être situés sur deux fragments génomiques (« scaffolds ») différents. Aucune séquence codante n'est interrompue par les insertions. Le caractère de coloration est stable dans les fleurs produites depuis 1998 par bouturages successifs.

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, le pétitionnaire a évalué la toxicité ainsi que le potentiel allergénique de la lignée 123.2.38.

- Analyse de la toxicité et de l'allergénicité des œillets

Les œillets sont utilisés à titre ornemental depuis des décennies, sans qu'aucun problème significatif de sécurité pour l'homme n'ait jamais été signalé. Les œillets ne sont pas connus comme étant des plantes toxiques. Aucune donnée ne fait état d'un risque particulier avec la variété réceptrice utilisée, la lignée 123 (Cream Cinderella).

Plusieurs cas d'allergie de contact à l'œillet ont été rapportés dans la littérature (Lamminpää et al., 1996; Stefanaki and Pitsios, 2008). Il s'agit essentiellement d'allergies professionnelles qui s'observent notamment chez les fleuristes, les maraîchers, les personnels d'entretien des serres ou des chercheurs, et non d'allergies après ingestion. Elles se traduisent principalement par des manifestations ORL et respiratoires (rhinites, asthme) et des manifestations cutanées (urticaire, dermites).

La lignée 123.2.38 se distingue de la variété réceptrice par la production de delphinidine, qui conditionne la couleur violette des fleurs de cette lignée, et par la production d'une acétolactate synthase mutante de tabac, qui confère une tolérance à des herbicides de la famille des sulfonylurées et a permis ainsi la sélection des transformants primaires. L'évaluation sanitaire ciblera plus particulièrement la delphinidine, dont l'œillet est naturellement dépourvu.

- Evaluation des risques potentiels associés à la delphinidine

La delphinidine, produite par modification génétique dans la lignée 123.2.38 dans le but de conférer une couleur violette aux fleurs d'œillets, existe naturellement dans beaucoup d'autres plantes (myrtilles, mûres, etc.) et elle est également présente comme additif (E163b) dans de nombreux aliments. La delphinidine n'est pas connue pour être toxique ou allergène.

Les anthocyanes ont fait l'objet de très nombreux travaux montrant des activités pharmacologiques variées, dont des propriétés anti-oxydantes ou anti-virales (Kong et al., 2003; Martin et al., 2013).

La delphinidine a été spécifiquement étudiée (en dehors de ce dossier) dans un test de Ames⁴ 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).

⁴ Le test de Ames est un test biologique permettant de déterminer le potentiel mutagène d'un composé chimique, dont le protocole a été décrit par Bruce Ames.

La delphinidine est absente des racines et des feuilles et présente dans les pétales au même titre que d'autres pigments comme la cyanidine et la pélargonidine. Des teneurs plus importantes en delphinidine sont observées dans d'autres plantes ornementales ou alimentaires, comme les myrtilles. Des teneurs plus importantes en delphinidine sont observées dans d'autres œillets génétiquement modifiés déjà autorisés (2.87 mg de delphinidine par gramme de pétales frais pour la lignée IFD-26407-2 (Florigene Moonvelvet™), pour 0.09 mg/g pour la lignée 123.2.38).

La littérature ne rapporte pas de réactions allergiques en relation avec des colorants alimentaires contenant de la delphinidine (Lucas et al., 2001).

On peut conclure que la delphinidine ne présente pas de risque toxique ou allergène, en particulier dans le cadre d'une présence dans des plantes à usage ornemental.

- Evaluation des risques potentiels associés à l'acétolactate synthase mutante

L'acétolactate synthase (ALS), ou acétohydroxyacide synthase, est une enzyme qui exerce deux rôles métaboliques (Duggleby, R.G., 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.

Duggleby and Pang (2000) font un état complet de la fonction biochimique de l'enzyme. L'acétolactate synthase est présente dans les plantes, les bactéries et les champignons, absente chez les animaux. Chez les plantes, elle 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 familles d'herbicides : les sulfonilurées (Chaleff and Ray, 1984; Ray, 1984), les imidazolinines (Shaner et al., 1984), les triazolopyrimidines (Subramanian et al.) et les pyrimidines.

La mutation du gène ALS conférant une tolérance à certains herbicides a été observée dans plusieurs plantes : *Brassica napus*, *Xanthium sp.*, *Lactuca sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*. Elle 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 tolérantes (Tan et al., 2005). L'ALS mutante de tabac utilisée dans la lignée 123.2.38, produite par la forme mutée *S4-Hra* du gène *SuRB*, est identique, sur le plan fonctionnel, aux nombreuses enzymes ALS retrouvées dans les plantes et les bactéries. Par ailleurs, l'ALS du soja, voisine de l'ALS du tabac, est rapidement dégradée en présence de protéases digestives (Mathesius et al., 2009).

Les risques potentiels liés à la toxicité et à l'allergénicité de la forme mutée du gène de l'ALS du tabac (*SuRB*) présente dans la lignée d'œillets 123.2.38 sont largement étudiés dans le présent dossier. La présence de cette enzyme n'est pas associée à un risque sanitaire particulier.

- Evaluation des risques potentiels associés aux ORF putatifs

L'analyse bioinformatique datant de 2006 a mis en évidence 2 ORFs (en fixant comme critères la présence d'un codon AUG et une taille minimum de 50 acides aminés) de 69 et 94 nucléotides, créés à la jonction en 3' du locus 1 d'insertion. Ces ORFs possèdent chacun un codon méthionine d'initiation de la traduction et un codon stop. La recherche d'ARN messenger correspondant à ces deux séquences n'a pas été effectuée. Aucune homologie de séquence n'a été identifiée entre ces ORFs et des protéines connues pour être toxiques ou allergènes.

Dans le cadre du dossier de renouvellement, ces données ont été approfondies et réactualisées dans un complément d'information fourni en décembre 2016. Les ORFs encadrés de deux codons stop, présents dans les jonctions des deux fragments d'insertion, ont été à nouveau recherchés. 24 ORFs potentiels ont été décrits, d'une taille comprise entre 10 à 122 acides aminés. La présence des transcrits correspondants n'a pas été recherchée. Les nouvelles analyses bioinformatiques confirment l'absence d'homologie significative avec des allergènes (8 acides aminés contigus étant la séquence minimale pour constituer un épitope ou 35% d'identité sur une séquence d'au moins 80 acides aminés) ou des toxines.

Les séquences codantes *SuRB* (*als*), *dfr* et *f3'5'h* ont également été analysées. Les analyses *in silico* réalisées en 2006 et actualisées en 2016 avec les bases de données les plus récentes, n'ont pas mis en évidence d'homologies significatives avec des allergènes ou des toxines.

Au regard de ces différents éléments, on peut donc conclure que la lignée d'œillets 123.2.38 ne présente pas de risque sanitaire supplémentaire par rapport à la lignée réceptrice non transgénique « Cream Cinderella ».

4. Evaluation des risques pour l'environnement

Les risques potentiels de la variété d'œillets FLO-40644-6 pour l'environnement concernent essentiellement les risques de dispersion de ses transgènes et leurs conséquences. La question d'un avantage sélectif éventuellement associé à la tolérance à certains herbicides conférée par le transgène *SuRB* présent dans les œillets FLO-40644-6 a également été examinée.

4.1. Risques potentiels de dispersion

Dans le dossier de demande de renouvellement, l'analyse phénotypique comparative de la variété d'œillets FLO-40644-6 avec la variété réceptrice non transgénique « Cream Cinderella » a été effectuée en Colombie de mai à décembre 2015. 18 traits liés à la morphologie des fleurs et de la plante entière ont été mesurés. L'essai consiste en trois blocs avec 12 plantes de chaque variété par bloc. Cependant, certains traits ont été mesurés sur un nombre plus restreint de plantes : 10 plantes pour la longueur et la largeur des pétales. On remarque, que pour le trait « longueur des étamines », les analyses ont été faites apparemment sur 8 plantes de chaque bloc (feuille « stamen length » du fichier « Trial data.ods »), alors que des mesures sur 12 plantes sont fournies (feuilles « data-Cream CII » et « data Moonlite » du fichier « Trial data.ods »). Les données ont été analysées par une analyse de variance incluant les effets variété, bloc et l'interaction entre variété et bloc.

D'un point de vue statistique, le CS du HCB souligne que la colonne de P-values/Block (table 5 en page 10 du document « Application for renewal ») est censée contenir des p-valeurs, *i.e.* des probabilités comprises entre 0 et 1 (la valeur 1.259 pour Stamen number devrait en fait être 0.29). De plus, lorsque sont effectuées des comparaisons multiples, il est important d'ajuster les p-valeurs (en utilisant par exemple la procédure de Benjamini-Hochberg si l'on souhaite contrôler le taux de faux-positifs). La comparaison inter-blocs n'apporte pas d'informations majeures, d'autant plus que ce ne sont pas les interactions qui sont testées, mais l'effet bloc, toutes variétés confondues.

Des différences significatives entre variétés sont observées pour 8 traits. Il s'agit de 4 traits de la plante entière : épaisseur du 5^{ème} nœud, longueur de la feuille, hauteur de la plante, longueur de la tige, et de 4 traits floraux : nombre de styles, hauteur du calice, nombre d'étamines et nombre total d'anthères.

Concernant les traits de la plante, en comparaison de la variété parentale, la variété génétiquement modifiée est plus haute, possède des feuilles moins longues et un 5^{ème} nœud moins épais. Il n'est pas possible de dire si ces différences se traduisent par des différences de vigueur des plantes. Cela semble biologiquement peu probable.

Concernant les traits floraux, en comparaison de la variété parentale, la variété génétiquement modifiée se caractérise par un calice moins haut, un nombre de styles légèrement plus faible, et des nombre d'étamines et d'anthères viables plus faibles (de 0 à 2 anthères viables par fleur, 0.3 en moyenne). Ces différences vont donc dans le sens d'une moindre fertilité et d'une moindre capacité à échanger des gènes par reproduction sexuée chez la variété génétiquement modifiée en comparaison de la variété parentale.

Dans l'évaluation phénotypique du dossier de demande d'autorisation initiale, faite en 2000, les seuls traits montrant une différence significative entre les variétés étaient la hauteur de la corolle (plus grande chez le transgénique) et le nombre d'anthères viables (plus faible chez le transgénique). Les 2 évaluations phénotypiques, bien que réalisées dans des conditions différentes, sont cohérentes.

L'évaluation phénotypique comparative présentée dans le dossier ne montre pas de risque accru de dispersion par reproduction sexuée et flux de gènes. La possibilité de dispersion des transgènes de la variété FLO-40644-6 dans l'environnement a été étudiée sur la base de la biologie des œillets et du mode de commercialisation envisagé.

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.

- Dispersion potentielle des transgènes par bouturage

L'œillet ne peut se disséminer *via* multiplication végétative sans intervention humaine car les plants ne peuvent pas produire naturellement de stolons, rhizomes, bulbes, etc. Les œillets ne peuvent produire dans la nature des plants régénérés à partir 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 prélevées 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 œillets génétiquement modifiés en enracinant des tronçons des tiges florales, soit *in vitro*, soit dans un substrat adapté (ex : sable, sable et terre, perlite) (Renuka et al., 2015). 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* (Casas et al., 2010). Le pourcentage de réussite d'une telle opération est faible, et d'autant plus faible lors d'un prélèvement de tronçons sur fleurs coupées ayant subi un transport à sec, le stress induisant la production d'éthylène, accélérant la sénescence, et de fait, réduisant la capacité des bourgeons axillaires à se développer. Un amateur éclairé pourrait toutefois 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 œillets (*Dianthus caryophyllus*, *Dianthus sp.*) afin de créer de nouvelles variétés. Il y a là un risque de transfert de gènes des œillets transgéniques et donc perte de la maîtrise de la diffusion des variétés transgéniques

proposées par le pétitionnaire. Le présent dossier n'apporte pas plus d'éléments nouveaux sur la capacité de régénération de plantes entières par bouturage à partir de fragments végétatifs.

Compte tenu de la forte adaptabilité écologique des *Dianthus sp.* et des possibilités d'hybridations interspécifiques (Nimura et al., 2006, 2008), le risque de voir ces œillets transgéniques être installés par des amateurs dans des zones de croissance d'autres *Dianthus* ne peut pas être exclu.

Le CS du HCB recommande que, si elle était autorisée, la mise sur le marché des œillets FLO-40644-6 soit accompagnée de mesures propres à répondre au risque de dispersion par bouturage par une communication à l'attention des sociétés d'amateurs quant aux possibilités de diffusion non contrôlée des œillets transgéniques.

- Dispersion 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 ou les graines.

L'éventualité d'une pollinisation à partir de plants coupés d'œillets cultivés est relativement faible compte tenu : (1) de l'environnement dans lequel les fleurs coupées sont placées (essentiellement des habitations), (2) du caractère uniquement entomophile de la pollinisation (principalement *via* des lépidoptères, qui n'ont pas un comportement de butinage optimal), (3) de la relative faiblesse de la production de pollen des œillets cultivés comparée à celle des 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 fleurs coupées (tenue en vase de 12 à 28 jours selon les variétés (Ebrahimzadeh et al., 2009) et des conditions de conservation, et (6) de la distance de dispersion relativement courte (quelques centaines de mètres).

Ce risque de pollinisation par le pollen des fleurs coupées n'est cependant pas nul. 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 pas à exclure. Concernant la pollinisation par les insectes, la pollinisation semble principalement assurée par des lépidoptères (Bloch et al., 2006; Kephart et al., 2006).

Si la probabilité d'une dispersion de pollen (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'œillet cultivé et les autres espèces de *Dianthus*. Aucune référence bibliographique ne permet d'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'introggression (*i.e.* de maintien) du transgène dans les populations sauvages. L'impact de cette introggression sur la conservation des ressources génétiques est actuellement difficilement quantifiable.

Concernant les risques de transfert de gènes par pollen vers les espèces sauvages, on peut noter que la forme sauvage de l'espèce *Dianthus caryophyllus* est présente en France, essentiellement dans le sud-est (<http://www.tela-botanica.org>). L'espèce n'est protégée que dans certains

départements du nord-ouest (Normandie, Bretagne). Etant donné le recouvrement entre l'aire de répartition de la forme sauvage et la région où l'œillet était cultivé dans les années 60 (Côte d'azur, avec 6000 producteurs d'œillet en 1960), on peut penser que si des hybridations, suivies d'un maintien des populations hybrides dans le milieu naturel avaient eu lieu, elles auraient été détectées par les naturalistes.

Concernant la dispersion *via* des graines produites par les fleurs coupées, celle-ci devrait être très réduite voire irréalisable en pratique considérant notamment que le processus de développement des graines dure cinq semaines à deux mois (Gatt et al., 1998; Sparnaaij and Koehorst-Van Putten, 1990) et qu'une fleur coupée en vase ne survit pas sur cette durée (3 semaines au plus). De plus, il semble difficile d'imaginer une pollinisation des fleurs avant la récolte pour des fleurs coupées car celles-ci sont encore fermées et carpelles et étamines ne sont pas suffisamment développés (Kim et al., 2005). Compte tenu de ces éléments, la dispersion *via* des graines produites par les fleurs coupées semble donc improbable. Dans le dossier de demande de renouvellement, une revue actualisée de la littérature (annexe 7 du dossier) confirme tous ces éléments, déjà mentionnés dans le dossier original.

Dans le cas peu probable d'une dispersion (voir ci-dessus), un membre du CS s'interroge sur les conséquences hypothétiques d'une modification de la morphologie florale (§5 du 4.1.) sur les pollinisateurs de ces plantes.

Au vu de ces éléments, le risque de dispersion dans l'environnement de la variété FLO-40644-6 ou de son transgène semble donc extrêmement faible. Une éventuelle présence dans l'environnement ne semble possible que suite à une mise en culture par des amateurs à partir de bouture de tiges florales, une technique dont le taux de succès serait très faible.

4.2. Avantage sélectif éventuel associé à la tolérance à certains herbicides

La forme mutée de l'acétolactate synthase de tabac insérée dans la variété FLO-40644-6 (*SurB S4-Hra*) confère aux œillets une tolérance non seulement au chlorosulfuron (herbicide utilisé pour sélectionner les transformants) mais aussi aux autres herbicides inhibiteurs de l'ALS.

Les inhibiteurs de l'ALS entrent dans la composition de produits herbicides utilisés essentiellement en milieux agricoles (sur agrumes, oliviers et vignes). En usage non agricole, deux substances actives inhibitrices de l'ALS sont utilisées uniquement en association avec une substance active d'une autre famille. Une troisième substance inhibitrice de l'ALS (le flazasulfuron) entre, seule ou en association avec d'autres matières actives, dans la composition d'une dizaine⁵ de produits herbicides autorisés pour un usage non agricole en France.

Ainsi, dans le cas peu probable d'une dispersion dans l'environnement suite à la mise sur le marché des œillets FLO-40644-6 sous forme de fleurs coupées (voir 4.1.), des plantes porteuses du transgène *SurB* ne présenteraient pas d'avantage sélectif, sauf dans le cas particulier où elles seraient exposées à des herbicides dont la seule matière active est le flazasulfuron. L'utilisation de ces herbicides est autorisée au stade de pré-émergence à début de post-émergence des adventices (feuilles de 10 cm maximum), pour le désherbage des allées de parcs, jardins publics, trottoirs, cimetières, voies de communications et des voies ferrées.

⁵ Consultation du site <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>, le 10 mars 2017.

5. Plan de surveillance post-commercialisation

Le dossier de demande de renouvellement d'autorisation présente un tableau général des importations de l'œillet FLORIGENE Moonlite™ dans l'UE depuis la date d'autorisation en 2007 jusqu'en mars 2016, date à laquelle ce bilan est écrit : 13 millions de fleurs ont été importées par un seul importateur basé aux Pays-Bas. Une augmentation régulière des importations dans l'UE est enregistrée. En 2015 (année civile), ce sont 2,12 millions de fleurs de FLORIGENE Moonlite™ qui ont été importées.

Le pétitionnaire indique que depuis la date d'autorisation de l'œillet FLORIGENE Moonlite™, 5 autres événements de modification transgéniques ont été aussi autorisés au niveau européen et commercialisés par Florigène : [FLORIGENEMoonaqua™, FLORIGENE®Moonberry™, FLORIGENE Moonvelvet™, FLORIGENE®Moontea™, et FLORIGENE®Moonvista™]. Deux autres événements FLORIGENE® Moonshadow™ (FLO-11363-1) et FLORIGENE Moondust™ (FLO-07442-4), également autorisés, ont par ailleurs été retirés pour des raisons commerciales.

Les autorisations accordées exigent que les fleurs importées comportent un étiquetage spécifique qui avertit que le produit est génétiquement modifié et n'est pas destiné à la consommation humaine et animale, ni à la culture, ceci en trois langues : anglais, français et allemand. Une mention spéciale est destinée au Japon (et écrite en anglais et japonais). Cette mesure est destinée à prévenir le consommateur.

Cette demande de renouvellement d'autorisation ne concernant pas la mise en culture, le risque à évaluer est donc circonscrit au niveau environnemental à une hybridation entre des populations de *Dianthus* sauvages et une fleur coupée d'œillet ou à l'établissement d'une population sauvage d'œillets FLORIGENE Moonlite™, ce qui est possible en théorie, mais qui n'a jamais été observé depuis les années 60 (voir 4.1). N'ayant pas identifié de risques prévisibles, pour cette demande d'autorisation d'importation pour commercialisation de fleurs coupées, le CS du HCB s'accorde avec le pétitionnaire à conclure qu'un plan de surveillance spécifique ne s'impose pas. Le plan de surveillance post-commercialisation doit être par conséquent centré sur une surveillance générale.

Le suivi post-commercialisation de l'importation de fleurs coupées de l'œillet Florigène® Moonlite™ et la surveillance générale qui a été diligentée (l'étiquetage spécifique des fleurs, la constitution de réseaux d'experts, d'une surveillance des populations de *Dianthus* sauvages à travers des institutions spécialisées, veille documentaire et bibliographique), sont conformes à la réglementation en vigueur et aux exigences notifiées au pétitionnaire lors de la délivrance de la première autorisation il y a 10 ans.

Le pétitionnaire a rédigé les rapports annuels de surveillance. Il a communiqué l'ensemble des rapports annuels requis par la surveillance post-commercialisation, et en a fait la synthèse. Elle indique clairement la méthodologie employée et les acteurs de cette surveillance. Un complément d'informations a par ailleurs été apporté à la demande de certains Etats-membres de l'UE.

La demande de renouvellement d'autorisation souligne qu'aucune nouvelle publication scientifique n'a conduit à l'identification d'effets non intentionnels ou d'exposition qui invalideraient les conclusions déjà établies. Elle souligne qu'aucune anomalie suspecte n'a été signalée sur la période d'autorisation concernée.

Les actions déployées en matière de surveillance post-commercialisation par le pétitionnaire apparaissent ainsi suffisantes. Il n'apparaît pas utile de prolonger la surveillance post-commercialisation au-delà de la période couverte par l'autorisation, sachant que la surveillance générale réalisée sur une période de 10 ans n'a montré aucun effet adverse pour la santé

humaine et animale ou l'environnement. Le CS se demande également si la surveillance générale post-commercialisation décrite dans le dossier est bien proportionnée aux risques identifiés.

Pour améliorer la surveillance de terrain sur les espèces endémiques de *Dianthus* en France, des experts français du secteur public ou privé, comme par exemple des experts de conservatoires botaniques, devraient être incités par les autorités compétentes à se rapprocher du pétitionnaire pour conduire avec lui la veille de terrain qu'il souhaite réaliser et qui contribue à faire progresser la connaissance scientifique⁶.

De plus, afin de vérifier le bon fonctionnement de la surveillance générale, il pourrait être envisagé de s'assurer de la puissance du dispositif et de la robustesse de la surveillance, ceci par une collaboration entre le pétitionnaire et les autorités compétentes des Etats membres ou d'autres organisations (comme par exemple des conservatoires...).

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 identifié suite à l'évaluation et l'analyse bioinformatique de lignée d'œillets 123.2.38 (Événement Florigene Moonlite™ FLO-40644-6), de la delphinidine, de l'enzyme mutante ALS, ou des ORFs potentiels créés par la modification génétique.
- Il est improbable que les fleurs coupées d'œillet produisent des graines ; le risque de dispersion par des graines produites par ces fleurs est donc quasi nul.
- Le risque de dispersion de gènes par le pollen de fleurs coupées d'œillet est faible mais non nul. Il ne lui serait cependant pas associé d'impact environnemental significatif.
- La dispersion par bouturage est difficile à réaliser mais possible par des techniques adaptées. Le CS du HCB recommande que, si elle était autorisée, la mise sur le marché des œillets FLO-40644-6 soit accompagnée de mesures propres à répondre au risque de dispersion par bouturage par une communication à l'attention des sociétés d'amateurs quant aux possibilités de diffusion non contrôlée des œillets transgéniques.
- Le plan de surveillance proposé par le pétitionnaire est adapté à l'utilisation prévue des œillets Florigene Moonlite™ FLO-40644-6 dans la demande d'autorisation de renouvellement de mise sur le marché. Le CS du HCB considère qu'il n'apparaît pas utile de prolonger la surveillance post-commercialisation au-delà de la période couverte par l'autorisation, sachant que la surveillance générale réalisée sur une période de 10 ans n'a montré aucun effet adverse pour la santé humaine et animale ou l'environnement.
- Pour améliorer la surveillance de terrain sur les espèces endémiques de *Dianthus* en France, des experts français du secteur public ou privé, comme par exemple des experts de conservatoires botaniques, devraient être incités par les autorités compétentes à se rapprocher du pétitionnaire pour conduire avec lui la veille de terrain qu'il souhaite réaliser

⁶ Le pétitionnaire a précisé dans le dossier de demande de renouvellement, en réponse à une question d'un Etat membre, que bien qu'il ait pu réaliser une surveillance générale (dans laquelle sont impliqués des établissements comme des laboratoires, des jardins botaniques, des conservatoires botaniques, chargés de signaler s'ils ont eu connaissance d'un événement quelconque concernant le genre *Dianthus*), il n'avait pu diligenter une surveillance de terrain (réalisées par des experts sur des espaces limités permettant d'examiner particulièrement les populations d'œillets et leurs évolutions) en Espagne, en Italie et en France car aucun expert n'avait accepté de faire ces enquêtes. Il n'explique pas les motifs évoqués.

et qui contribue à faire progresser la connaissance scientifique. De plus, afin de vérifier le bon fonctionnement de la surveillance générale, il pourrait être envisagé de s'assurer de la puissance du dispositif et de la robustesse de la surveillance, ceci par une collaboration entre le pétitionnaire et les autorités compétentes des Etats membres ou d'autres organisations.

7. Bibliographie

Bloch, D., Werdenberg, N., and Erhardt, A. (2006). Pollination crisis in the butterfly-pollinated wild carnation *Dianthus carthusianorum*? *New Phytol.* *169*, 699–706.

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.

Casas, J.L., Olmos, E., and Piqueras, A. (2010). In Vitro Propagation of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). In *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants*, S.M. Jain, and S.J. Ochatt, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 109–116.

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

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

Ebrahimzadeh, A., Hosseinzadeh, E., Jiménez, S., and Lao, M.T. (2009). Influence of ethanol on the storage life and bud opening of carnation (*Dianthus Caryophyllus* L.) flowers during wet storage. *Acta Hortic.* 259–264.

Gatt, M.K., Hammett, K.R., Markham, K.R., and Murray, B.G. (1998). Yellow pinks: interspecific hybridization between *Dianthus plumarius* and related species with yellow flowers. *Sci. Hortic.* *77*, 207–218.

Kephart, S., Reynolds, R.J., Rutter, M.T., Fenster, C.B., and Dudash, M.R. (2006). Pollination and seed predation by moths on *Silene* and allied Caryophyllaceae: evaluating a model system to study the evolution of mutualisms. *New Phytol.* *169*, 667–680.

Kim, Y.A., Joung, Y.H., and Shin, H.K. (2005). Morphological Observation of Floral Organs to Investigate the Cause of Poor Pollen Formation in Carnation "Desio." *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* *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.

Lamminpää, A., Estlander, T., Jolanki, R., and Kanerva, L. (1996). Occupational allergic contact dermatitis caused by decorative plants. *Contact Dermatitis* *34*, 330–335.

Lucas, C.D., Hallagan, J.B., and Taylor, S.L. (2001). The role of natural color additives in food allergy. *Adv. Food Nutr. Res.* *43*, 195–216.

Martin, C., Zhang, Y., Tonelli, C., and Petroni, K. (2013). Plants, Diet, and Health. *Annu. Rev. Plant Biol.* *64*, 19–46.

Mathesius, C.A., Barnett, J.F., Cressman, R.F., Ding, J., Carpenter, C., Ladics, G.S., Schmidt, J., Layton, R.J., Zhang, J.X.Q., Appenzeller, L.M., et al. (2009). Safety assessment of a modified acetolactate synthase protein (GM-HRA) used as a selectable marker in genetically modified soybeans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* *55*, 309–320.

- 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**.
- Nimura, M., Kato, J., and Mii, M. (2006). Interspecific hybrid production by reciprocal crosses between *Dianthus caryophyllus* L. and *Dianthus × isensis* Hirahata et Kitamura. *J. Hortic. 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.
- Ray, T.B. (1984). Site of action of chlorsulfuron: inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plant Physiol.* **75**, 827–831.
- Renuka, K., Chandrasekhar, R., and Pratap, M. (2015). Effect of different media treatments on rooting of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cuttings of cv. BALTICO under poly house conditions. *ASIAN J. Hortic.* **10**, 118–121.
- Shaner, D.L., Anderson, P.C., and Stidham, M.A. (1984). Imidazolinones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol.* **76**, 545–546.
- Southan, M.D., and Copeland, L. (1996). Physical and kinetic properties of acetohydroxyacid synthase from wheat leaves. *Physiol. Plant.* **98**, 824–832.
- Sparnaaij, L.D., and Koehorst-Van Putten, H.J.J. (1990). Selection for early flowering in progenies of interspecific crosses of ten species in the genus *Dianthus*. *Euphytica* **50**.
- Stefanaki, E.C., and Pitsios, C. (2008). Occupational dermatitis because of carnation. *Contact Dermatitis* **58**, 119–120.
- Subramanian, M.V., Hung, H.-Y., Dias, J.M., Miner, V.W., Butler, J.H., and Jachetta, J.J. Properties of Mutant Acetolactate Synthases Resistant to Triazolopyrimidine Sulfonamide. *Plant Physiol.* **94**, 239–244.
- Tan, S., Evans, R.R., Dahmer, M.L., Singh, B.K., and Shaner, D.L. (2005). Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag. Sci.* **61**, 246–257.
- Yagi, M., Kosugi, S., Hirakawa, H., Ohmiya, A., Tanase, K., Harada, T., Kishimoto, K., Nakayama, M., Ichimura, K., Onozaki, T., et al. (2014). Sequence Analysis of the Genome of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *DNA Res.* **21**, 231–241.

Annexe 1 : 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 BUSUTIL
244, boulevard Saint-Germain
75007 PARIS

12 JAN. 2017

Paris, le

Objet : saisine du Haut conseil des biotechnologies sur un dossier de demande de mise sur le marché d'OGM

Références : saisine HCB – dossier C/NL/04/02_001

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,

Dans le cadre de la directive 2001/18/CE relative à la dissémination volontaire d'OGM dans l'environnement, l'évaluation initiale d'un dossier de demande de mise sur le marché est confiée à l'Etat membre qui a reçu le dossier. Lorsque l'Etat membre a transmis son rapport d'évaluation à la Commission européenne, celle-ci adresse le dossier à l'ensemble des Etats membres qui disposent de 60 jours pour faire des commentaires, demander des informations complémentaires ou émettre des objections à la mise sur le marché. La formulation ou non d'objections par les Etats membres détermine la suite de la procédure.

Le dossier suivant, qui a fait l'objet d'un rapport d'évaluation des Pays-Bas, a été soumis aux Etats membres :

- dossier C/NL/04/02_001, concernant le renouvellement de la mise sur le marché d'oeillets génétiquement modifiés, lignée 123.2.38, pour l'importation et la commercialisation de fleurs coupées.

Les autorités françaises ont émis une objection de principe à la mise sur le marché de l'OGM auprès de la Commission européenne dans l'attente d'une évaluation du dossier par le HCB. Une telle évaluation est nécessaire pour que les autorités françaises puissent, le cas échéant, motiver ou actualiser leur position sur la mise sur le marché de l'OGM, auprès de la Commission européenne.

Dans cette perspective, j'ai l'honneur de vous demander, par la présente saisine, de bien vouloir procéder à une évaluation de ce dossier afin de rendre un avis au plus tard le 15 mars 2017.

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

Le sous-directeur de la qualité, de la santé
et de la protection des végétaux

Alain TRIDON

Annexe 2 : Elaboration de l'avis

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 23 février 2017⁷, ainsi que d'échanges ultérieurs par voie électronique, 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 :

Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Philippe Berny, Yves Bertheau (démissionnaire), Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno Chauvel, Denis Couvet, Elie Dassa, Hubert De Verneuil, Nathalie Eychenne, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, André Jestin, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Valérie Le Corre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Eliane Meurs, Nadia Naffakh, Didier Nègre, Jean-Louis Noyer, Sergio Ochatt, Jean-Christophe Pagès, Daniel Parzy, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte⁸.

Le dossier a été examiné par deux experts rapporteurs sélectionnés parmi les membres du CS du HCB 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.

⁷ Membres du CS présents et représentés lors de la discussion du projet d'avis en séance du 23 février 2017 : Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Pascal Boireau, Bruno Chauvel, Denis Couvet, Elie Dassa, Hubert De Verneuil, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Eliane Meurs, Didier Nègre, Sergio Ochatt, Jean-Christophe Pagès, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Jean-Luc Vilotte.

⁸ Composition du CS en vigueur suite au décret de nomination des membres du HCB du 30 décembre 2014 et à la loi du 2 décembre 2015.