

**Avis en réponse à la saisine 150519 - dossier C-NL-13-02.
Paris, le 7 septembre 2015**

. Comité Scientifique Du Haut Conseil Des Biotechnologies, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie Anne Barny, Florence Bellivier, Philippe Berny, Yves Bertheau, Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno Chauvel, et al.

► **To cite this version:**

. Comité Scientifique Du Haut Conseil Des Biotechnologies, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie Anne Barny, Florence Bellivier, et al.. Avis en réponse à la saisine 150519 - dossier C-NL-13-02. Paris, le 7 septembre 2015. [Rapport de recherche] Haut Conseil des Biotechnologies. 2015, 21 p. hal-02917593

HAL Id: hal-02917593

<https://hal.inrae.fr/hal-02917593>

Submitted on 19 Aug 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.

Copyright

COMITÉ SCIENTIFIQUE

AVIS

en réponse à la saisine 150519-saisine HCB - dossier C-NL-13-02¹.

Paris, le 7 septembre 2015

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 20 mai 2015 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/13/02** de demande de mise sur le marché de la lignée d'œillets génétiquement modifiés **FLO-40685-1** à des fins d'importation et de commercialisation de fleurs coupées.

Ce dossier a été déposé par la société **Suntory Holdings Limited** auprès des autorités compétentes néerlandaises dans le cadre 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. Par cette saisine, les autorités compétentes françaises consultent le HCB au stade ultime de la préparation au vote des Etats membres à la Commission européenne.

Le Comité scientifique (CS)² du HCB a examiné le dossier en séance du 25 juin 2015 sous la présidence de Jean-Christophe Pagès. Le présent avis a été adopté par voie électronique le 7 septembre 2015 et publié le 10 septembre 2015.

¹ La saisine « **150519-saisine HCB- dossier C-NL-13-02** » est reproduite dans l'Annexe 1.

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

RESUME DE L'AVIS³

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi dans le cadre de la directive 2001/18/CE d'une demande d'avis relative au dossier C/NL/13/02 dans le but d'éclairer les autorités compétentes françaises en perspective d'un vote à la Commission européenne. Déposé par la société Suntory Holdings Limited, ce dossier est une demande d'autorisation de mise sur le marché de la lignée d'œillets génétiquement modifiés FLO-40685-1 à des fins d'importation et de commercialisation de fleurs coupées dans l'Union européenne.

Description du produit

La lignée FLO-40685-1 résulte de la transformation de la lignée Cream Cinderella avec une construction génétique contenant trois cassettes d'expression dont deux incluent des gènes impliqués dans la régulation de la synthèse des anthocyanes dans le but de conférer aux fleurs une couleur pourpre. La troisième cassette code une acétolactase synthétase (ALS) mutante de tabac (*Nicotiana tabacum*), conférant une tolérance aux herbicides de la famille des sulfonylurées, exploitée uniquement pour la sélection des transformants primaires.

Quatre loci d'insertion sont présents dans la lignée FLO-40685-1, chacun portant des intégrations d'ADN-T différentes, partielles ou totales. Le caractère de coloration est stable au cours des bouturages successifs. Aucun autre transgène que ceux portés par l'ADN-T n'est présent dans la lignée FLO-40685-1. L'insertion n'interrompt pas de séquences codantes ou régulatrices connues ou reconnaissables de l'œillet.

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 FLO-40685-1.

Les protéines produites par les transgènes et les pigments de delphinidine et cyanidine résultant de leur expression sont naturellement présents dans d'autres fleurs que les œillets et dans des fruits comestibles. La teneur en delphinidine dans la lignée d'œillets FLO-40685-1 est supérieure à celle des lignées précédemment commercialisées mais inférieure à celles d'autres plantes ornementales ou alimentaires comme la myrtille.

L'acétolactase synthétase (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 FLO-40685-1 n'est pas associée à un risque sanitaire particulier.

La protéine ALS et les protéines DFR et F3'5'H exprimées dans l'œillet transgénique ont un potentiel allergénique négligeable. L'absence d'identité ou d'homologie avec des allergènes avérés répertoriés dans la banque FARRP ne suggère pas non plus de caractère adjuvant. Le contact avec l'œillet transgénique ne présente *a priori* pas de risque d'allergénicité supérieur à celui d'un œillet non GM.

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

Risques de dissémination et impact sur l'environnement

Les risques potentiels pour l'environnement concernent les risques de dissémination 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 disséminés 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 et qu'une fleur coupée en vase ne survit pas sur cette durée.

Par ailleurs, dans l'éventualité d'une dissémination, il est peu probable que le caractère de tolérance aux herbicides inhibiteurs d'ALS confère un avantage sélectif aux plantes porteuses de la mutation *S4-Hra* du gène *SurB*.

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/13/02, 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, même s'il souhaiterait qu'elles soient plus détaillées. Le plan de surveillance repose notamment sur des questionnaires remis aux importateurs, sur le retour des consommateurs, le travail et les rapports de surveillance d'experts, une revue bibliographique, et des échanges avec les herbiers et jardins botaniques. Le CS se félicite que le pétitionnaire ait annoncé la recherche d'experts supplémentaires pour assister les deux experts actuellement prévus pour contribuer à la surveillance des œillets commercialisés dans l'Union européenne.

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 la lignée d'œillet FLO-40685-1, de la delphinidine, de l'enzyme mutante ALS ainsi que des protéines DFR et F3'5'H exprimée(s) dans l'œillet transgénique, ou des ORFs potentiels créés par la modification génétique.

- Il est improbable que les fleurs coupées d'œillet produisent des graines; le risque de dissémination par des graines produites par ces fleurs est donc quasi nul.
- Le risque de dissémination de gènes par le pollen de fleurs coupées d'œillet est faible mais non nul. Il ne lui serait cependant pas associé d'impact environnemental significatif.
- La dissémination par bouturage est difficile à réaliser mais possible par des techniques adaptées.
- Suite à une éventuelle dissémination, le caractère de tolérance aux herbicides inhibiteurs d'ALS ne confèrerait vraisemblablement pas d'avantage sélectif aux plantes porteuses du transgène *SurB*.

Le plan de surveillance proposé par le pétitionnaire semble adapté à l'utilisation prévue des œillets FLO-40685-1 dans la demande d'autorisation de mise sur le marché C/NL/13/02. Le CS du HCB recommande toutefois que, si elle était autorisée, la mise sur le marché des œillets FLO-40685-1 soit accompagnée de mesures propres à répondre au risque de dissémination par bouturage par une communication à l'attention des sociétés d'amateurs quant aux possibilités de diffusion non contrôlée des œillets transgéniques.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	6
2. CARACTERISTIQUES DES PLANTES GENETIQUEMENT MODIFIEES.....	6
2.1 DESCRIPTION DU PRODUIT.....	6
2.2 CARACTERISTIQUES DE LA CONSTRUCTION GENETIQUE	6
2.3 METHODE DE TRANSFORMATION.....	7
2.4 CARACTERISTIQUES DES CÉILLETS FLO-40685-1	7
3. EVALUATION DES RISQUES POUR LA SANTE HUMAINE ET ANIMALE.....	9
4. EVALUATION DES RISQUES POUR L'ENVIRONNEMENT.....	12
4.1 RISQUES POTENTIELS DE DISSEMINATION	12
4.2 AVANTAGE SELECTIF EVENTUEL ASSOCIE A LA TOLERANCE A CERTAINS HERBICIDES.....	15
5. PLAN DE SURVEILLANCE POST-COMMERCIALISATION	15
6. CONCLUSIONS	17
7. BIBLIOGRAPHIE.....	17
ANNEXE 1 : SAISINE	20
ANNEXE 2 : ELABORATION DE L'AVIS.....	21

1. Introduction

Le dossier C/NL/13/02, déposé par la société Suntory Holdings Limited auprès des autorités compétentes néerlandaises dans le cadre de la directive 2001/18/CE⁴, est une demande d'autorisation de mise sur le marché de la lignée d'œillets génétiquement modifiés FLO-40685-1 à des fins d'importation et de commercialisation de fleurs coupées. La présente demande exclut la culture ainsi que la consommation animale et humaine.

Conformément à la directive 2001/18/CE, la Commission européenne a adressé le rapport d'évaluation des Pays-Bas ainsi que le dossier du pétitionnaire à l'ensemble des Etats membres. Par cette saisine, le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) est saisi par les autorités compétentes françaises d'une demande d'avis sur ce dossier au stade ultime de la préparation au vote des Etats membres à la Commission européenne.

2. Caractéristiques des plantes génétiquement modifiées

2.1 Description du produit

La lignée FLO-40685-1 a été génétiquement modifiée dans le but de conférer aux fleurs une couleur pourpre sombre. Elle porte par ailleurs 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), qui assure par ailleurs l'hydroxylation des composés DHK et DHQ en DHM.

L'œillet est dépourvu du gène qui code l'enzyme F3'5'H. Afin de favoriser la voie de biosynthèse de la delphinidine, la lignée FLO-40685-1 exprime le gène *F3'5'H* de pensée et le gène *DFR* de pétunia.

2.2 Caractéristiques de la construction génétique

La construction génétique à l'origine de l'événement FLO-40685-1 provient du plasmide binaire pCGP1991 (27 488 pb⁵). Elle consiste en trois cassettes d'expression encadrées par les séquences répétées gauche (LB⁶) et droite (RB⁷) d'un plasmide Ti⁸ délimitant la partie d'ADN transférée dans

⁴ Directive 2001/18/CE du Parlement européen et du Conseil du 12 mars 2001 relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement et abrogeant la directive 90/220/CEE du Conseil.

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32001L0018:FR:HTML>

⁵ pb : paire de bases d'ADN.

⁶ LB : *left border*, bordure gauche de la région d'ADN destinée au transfert (ADN-T).

le génome des plantes, séparées par des régions intergéniques plus ou moins longues provenant des vecteurs utilisés pour les clonages (série des pBluescript et pUC).

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

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

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

2.3 Méthode de transformation

A l'origine de la lignée FLO-40685-1, la lignée 123 (Cream Cinderella) à fleurs roses a été inoculée par la souche AGLO d'*A. tumefaciens* portant le plasmide binaire pCGP1991. Après élimination de l'agrobactérie avec l'antibiotique timentine, les transformants primaires ont été sélectionnés grâce à l'expression du gène *SuRB*, conférant la tolérance à l'herbicide sulfuron. L'absence d'agrobactéries résiduelles dans les transformants primaires a été vérifiée par amplification PCR d'une région de 430 pb du gène *VirG* d'*A. tumefaciens*.

2.4 Caractéristiques des œillets FLO-40685-1

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

Le nombre de sites d'insertion a été déterminé par des hybridations moléculaires de type Southern, en utilisant une préparation d'ADN génomique de feuilles de plantes transgéniques et de leurs homologues non transformées. Deux enzymes de restriction différentes (*EcoRI* et *BglII*) ont été utilisées séparément pour digérer l'ADN génomique. Les produits de digestion ont été éprouvés avec des sondes radioactives correspondant à des régions spécifiques de chaque cassette transférée, aux régions RB et LB, mais également avec six sondes couvrant la totalité des parties non destinées au transfert du plasmide binaire. Des expériences de reconstruction ont permis d'estimer le nombre de copies des ADN-T et transgènes.

⁷ RB : *right border*, bordure droite de l'ADN-T.

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

Ces expériences montrent que quatre copies de l'ADN-T du plasmide binaire pCGP1991 ont été intégrées dans la lignée FLO-40685-1 et qu'il n'y a pas de région extérieure à l'ADN-T du plasmide pCGP1991 insérée dans l'ADN de cette plante. Des expériences de PCR ont aussi été réalisées afin de vérifier qu'il n'y a pas eu d'insertion, dans la plante transgénique, du gène procaryote de résistance à la tétracycline (gène présent sur le plasmide pCGP1991, à l'extérieur de l'ADN-T).

- Structure et séquence des inserts

Les quatre inserts ont été séquencés. Ils sont intégrés de façon stable dans le génome nucléaire. Leurs insertions n'ont pas interrompu de séquences codantes ou régulatrices connues ou reconnaissables de la lignée réceptrice. Leur organisation est décrite ci-dessous :

- Le locus 1 comprend deux ADN-T en tandem, le premier étant tronqué au début du promoteur du gène *DFR* alors que le deuxième est entier. Les deux copies sont séparées par une petite région d'ADN génomique de moins de 300 pb.
- Le locus 2 ne contient pas d'ADN-T entier, mais seulement la frontière droite et le terminateur *D8*.
- Le locus 3 correspond à deux ADN-T tronqués en position tête-bêche au niveau de la frontière droite. Le premier fragment porte le transgène *F3'5'H* dont le promoteur est tronqué, et le deuxième ne porte qu'une partie de la séquence codante du gène *F3'5'H* et le terminateur *D8*.
- Le locus 4 contient un fragment d'ADN-T constitué de la frontière gauche, du pCaMV35S et d'un fragment d'environ 600 pb de la séquence codante du gène *SuRB*.

La lignée FLO-40685-1 porte donc deux copies du gène *SuRB*, quatre copies du gène *F3'5'H* et deux copies du gène *DFR*. Certaines de ces copies sont tronquées.

- Séquençage des régions flanquantes

Cent cinquante paires de bases ont été séquencées dans les régions flanquant les quatre insertions.

- Identification des ORFs⁹ potentiels présents dans les inserts et leurs jonctions

Les analyses bioinformatiques ont mis en évidence 2996 ORFs au sein des quatre insertions et 64 ORFs dans les régions flanquantes. L'analyse du potentiel toxique et allergène de ces ORF est présentée dans le chapitre 3.

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

Les fleurs coupées, qui font l'objet de cette demande d'autorisation de mise sur le marché, sont prélevées sur des plantes issues de bouturages successifs des transformants primaires. Le matériel transgénique ne sera pas utilisé dans des croisements avec d'autres cultivars d'œillet dans le cadre de cette demande. La question de l'héritabilité des transgènes n'a pas été abordée.

La stabilité des transgènes est déduite du maintien de la couleur des fleurs après plusieurs bouturages successifs. Les analyses réalisées à partir de quinze cultures au cours des sept

⁹ ORF (*Open Reading Frame*) : cadre ouvert de lecture, détecté par des programmes informatiques, correspondant à une séquence d'ADN qui peut coder, si elle est préalablement transcrite, un peptide ou une protéine. Des analyses supplémentaires sont nécessaires pour tester si un ORF potentiel ainsi détecté est effectivement transcrit en ARN et traduit en peptide ou protéine.

dernières années montrent que moins de 1 % des fleurs sont hors-type (rose ou blanche au lieu de pourpre sombre). Cette proportion n'augmente pas au cours des bouturages successifs.

- Expression des transgènes

L'expression des transgènes a été déterminée par hybridation moléculaire et par dosage des pigments principaux par chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC) :

- Des analyses northern ont été réalisées à partir d'ARN totaux extraits de pétales de plantes génétiquement modifiées ou non. Les différents ARN transcrits ont été recherchés à l'aide de sondes spécifiques. Les ARN de taille escomptée ont été identifiés dans les pétales des fleurs des plantes FLO-40685-1 mais pas dans ceux des plantes réceptrices Cream Cinderella. La coloration n'est visible que dans les pétales de ces plantes du fait de la spécificité des promoteurs des transgènes *F3'5'H* et *DFR*, et de la localisation des substrats sur lesquels agissent les enzymes produits par ces transgènes.
- Dosés par HPLC, les pigments de delphinidine et cyanidine représentent respectivement 1,79 mg/g et 0,02 mg/g de poids frais des pétales de fleurs des plantes FLO-40685-1, contre 0 mg/g et 0,01 mg/g chez les plantes réceptrices Cream Cinderella. La production de delphinidine et de cyanidine résulte de l'activité enzymatique combinée des transgènes *F3'5'H* et *DFR* dans la lignée FLO-40685-1. Pour comparaison concernant les pigments nouvellement produits dans cette lignée transgénique par rapport à la lignée réceptrice, le CS du HCB rappelle que, dépourvues d'enzyme *F3'5'H*, les variétés d'œillets non transgéniques ne produisent pas de delphinidine tandis qu'elles peuvent produire des teneurs en cyanidine jusqu'à plus de cent fois supérieures à celle trouvée dans la lignée FLO-40685-1.

3. Evaluation des risques pour la santé humaine et animale

La demande concerne un usage exclusivement ornemental ; les œillets ne sont pas destinés à l'alimentation humaine et animale. Dans l'hypothèse d'une consommation fortuite, par exemple dans le cas où les œillets seraient utilisés en décor de salade, le pétitionnaire a évalué la toxicité ainsi que le potentiel allergénique de la lignée FLO-40685-1.

- **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 (Lamminpaa 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 FLO-40685-1 se distingue de la variété réceptrice par la production de delphinidine et de cyanidine, qui conditionne la couleur pourpre sombre des fleurs de cette lignée, et par la production d'une acétolactase synthétase mutante de tabac, qui confère une tolérance à des

herbicides de la famille des sulfonilurées et a permis ainsi la sélection des transformants primaires. La cyanidine étant un pigment présent dans de nombreuses variétés d'œillets non transgéniques, 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 FLO-40685-1 dans le but de conférer une couleur pourpre ou 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 (Broadhurst, 2001; Kong et al., 2003, 2008; Martin et al., 2013).

La delphinidine a été spécifiquement étudiée (en dehors de ce dossier) dans un test de Ames¹⁰ sur cinq souches de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537 et TA1538), avec et sans activation métabolique, sans montrer d'effet mutagène (Brown and Dietrich, 1979).

La delphinidine est absente des racines et des feuilles et présente dans les pétales au même titre que d'autres pigments comme la cyanidine et la pélargonidine. La DL₅₀¹¹ par voie orale d'un mélange de ces trois anthocyanes obtenu après extraction à partir de myrtilles est supérieure à 20 et 25 g/kg de poids corporel respectivement chez le rat et la souris (Pourrat et al., 1967). Des teneurs plus importantes en delphinidine sont observées dans d'autres plantes ornementales ou alimentaires, comme les myrtilles.

La littérature ne rapporte pas de réactions allergiques en relation avec des colorants alimentaires contenant de la delphinidine (Lucas et al., 2011).

On peut conclure que la delphinidine ne présente pas en soi 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'acétolactase synthétase mutante**

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

La revue de Duggleby and Pang (2000) fait un état complet de la fonction biochimique de l'enzyme. L'acétolactate synthétase est présente dans les plantes, les bactéries et les champignons, absente chez les animaux. Chez les plantes, 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).

¹⁰ 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.

¹¹ DL₅₀ : DL signifie « dose létale ». La DL₅₀ est la quantité d'une matière, administrée en une seule fois, qui cause la mort de 50 % d'un groupe d'animaux d'essai. La DL₅₀ est une façon de mesurer le potentiel toxique à court terme (toxicité aiguë) d'une molécule.

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

La mutation du gène ALS conférant une 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 FLO-40685-1, 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.

La recherche des identités et homologues de séquence avec les allergènes de différentes banques (SwissProt, FARRP, versions 2012 et versions 2015 à la demande de l'EFSA) effectuée avec les algorithmes classiques (FASTA, BLAST, matrice BLOSUM62), ne fournit aucune homologie globale (homologie $\geq 35\%$ sur une fenêtre de 80 résidus) ou locale (100 % d'homologie sur une fenêtre de 8 résidus successifs) de l'enzyme ALS avec des allergènes avérés.

Par ailleurs, l'ALS du soja, voisine de l'ALS du tabac, est rapidement dégradée en présence de protéases digestives (Mathesius et al., 2009).

- **Evaluation des risques potentiels associés aux protéines DRF et F3'5'H**

En utilisant la même méthodologie de recherche d'homologie de séquence, aucune homologie significative des protéines DRF et F3'5'H avec des allergènes avérés n'a été identifiée.

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

La recherche des homologues de séquences des ORF putatifs avec les allergènes des différentes banques citées ci-dessus indique, parmi les ORF présents dans les insertions des ADN-T, des homologues fortuites avec des segments non conservés d'allergènes de l'ascomycète *Davidiella tassiana* et de l'ambrosie, *Ambrosia artemisiifolia*, et parmi les ORF présents dans les régions flanquantes, une homologie locale de huit résidus consécutifs (NVKQAVLD) avec la subtilisine Calsberg du *Bacillus licheniformis*. Le pétitionnaire considère, à juste titre, que, cette séquence a peu de chances de correspondre à un épitope car elle est peu exposée sur le profil hydrophatique (Hopp and Woods, 1981) de la protéine.

D'autres homologues locaux de quelques acides aminés sont observés avec différents allergènes sur les ORF identifiés aux jonctions des insertions avec l'ADN génomique des œilletts. Ces allergènes sont d'origines très variées, animale (acarien, abeille, poisson, poulet), fongique (*Aspergillus*) ou végétale (pêche). Il n'y a apparemment pas de lien phylogénétique entre ces différentes espèces et les séquences concernées ne semblent pas correspondre à des épitopes exposés.

A la demande de l'EFSA, des compléments d'information concernant l'analyse bio-informatique des régions flanquantes, des ORF et des protéines exprimées dans l'œillet transgénique ont été fournis :

- Les analyses effectuées confirment que les sites d'insertion se situent exclusivement dans quatre régions non codantes du génome de l'œillet.
- Les analyses effectuées à l'aide des versions les plus récentes d'une banque protéique non-redondante, de la banque SwissProt et de la banque d'allergènes FARRP, ont identifié 2996

ORFs au niveau des inserts et 64 au niveau des jonctions. Les homologues globales et locales avec la dernière version de la banque FARRP, sont respectivement au nombre de 9 et de 8. Elles correspondent aux homologues précédemment identifiées avec des allergènes de *Davidiella tassiana* et de l'ambroisie.

Les protéines correspondant aux ORFs identifiés ne possèdent pas de codon initiateur et qu'il n'y a pas de site de fixation aux ribosomes ni de séquences régulatrices (promoteur...) associés aux ORF identifiés. Il est donc peu probable qu'elles puissent être exprimées dans l'œillet transgénique.

- Analyse de l'allergénicité des plantes d'origine des transgènes

Les gènes *DFR* du pétunia (*Petunia hybrida*) et *F3'5'H* de la pensée (*Viola hortensis*) ayant été utilisés, l'allergénicité du pétunia et de la pensée a été considérée. Une analyse bibliographique ne révèle aucun résultat concernant l'allergie au pétunia ou à la pensée.

On peut donc conclure que la lignée d'œillets FLO-40685-1 ne présente pas de risque sanitaire supplémentaire par rapport à la lignée réceptrice Cream Cinderella.

4. Evaluation des risques pour l'environnement

Les risques potentiels de la variété d'œillets FLO-40685-1 pour l'environnement concernent essentiellement les risques de dissémination 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-40685-1 a également été examinée.

4.1 Risques potentiels de dissémination

L'analyse comparative de la variété FLO-40685-1 avec la variété réceptrice non transgénique montre une précocité de floraison similaire et une morphologie identique, hormis pour trois composantes : la hauteur de la plante, la longueur et l'épaisseur du cinquième nœud. Ces éléments n'étant pas associés à un risque accru de dissémination dans l'environnement, la possibilité de dissémination des transgènes de la variété FLO-40685-1 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.

- Dissémination potentielle des transgènes par bouturage

L'œillet ne peut se disséminer via multiplication végétative sans intervention humaine car les plants ne peuvent produire naturellement de stolons, rhizomes, bulbes, etc. Les œillets ne peuvent produire dans la nature des plants régénérés à partir de fragments de tissus. Le pétitionnaire indique dans ce sens qu'aucun œillet cultivé de l'espèce *Dianthus caryophyllus* issu de fragments de tissus n'a été observé en dehors des champs de production en Colombie ou en Equateur. Cette affirmation peut être corroborée par l'exemple des cultures d'œillet sur la côte d'azur, avec 6000 producteurs d'œillet en 1960. D'autres espèces d'œillets cultivés sont

observées hors des champs de production en Europe (Tutin and Walters, 1993), mais il s'agirait plutôt dans ce cas de populations férales (Holzner and Immonen, 1982) plutôt que de plants issus de fragments de tissus.

Des plants d'œillets pourraient, en revanche, être produits à partir de tissus de plants transgéniques *via* des techniques de bouturages (cultures de tissus ou autres techniques de multiplication). Cela dit, les œillets transgéniques étant commercialisés sous forme de fleurs coupées, les techniques optimales de multiplication végétative par enracinement de boutures végétatives 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) (Thomas et al., 2003). En effet, il existe à l'aisselle de chaque feuille un bourgeon végétatif dormant que l'on peut développer en enracinant les tronçons de tige en condition d'humidité élevée ou bien *in vitro* (Meena and Shanti, 2006) (Jean-Paul Onesto, communication personnelle au titre d'expert d'un précédent dossier d'œillet évalué au HCB). Le pourcentage de réussite d'une telle opération est peu élevé, et il est encore plus faible lors d'un prélèvement de tronçons sur fleurs coupées ayant subies un transport à sec (comme décrit dans le dossier, p. 29), 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 gène des œillets transgéniques et donc perte de la maîtrise de la diffusion des variétés transgéniques proposées par le pétitionnaire.

Compte tenu de la forte adaptabilité écologique des *Dianthus sp.* (Wu, 2007) et des possibilités d'hybridations interspécifiques (Atanasova, 1998; Nimura et al., 2006; Nimura et al., 2008), le risque de voir ces œillets transgéniques être installés par des amateurs dans des zones de croissance d'autres *Dianthus* ne peut pas être exclu.

- Dissémination potentielle des transgènes par le pollen ou les graines

Les deux autres voies de dispersion de gènes à partir des fleurs coupées impliquent une dispersion *via* le pollen 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 (expertise CNIH et URIH Sophia Antipolis, C. Metay), 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, même si la pollinisation semble

principalement assurée par des lépidoptères (noctuelles et sphinx), les fleurs d'œillets peuvent être visitées marginalement par les abeilles et les syrphes (cas de *D. silvester* ; (Erhardt, 1988)), ce qui élargit le spectre des pollinisateurs potentiels.

Concernant les estimations de dispersion de pollen dans le genre *Dianthus*, celles-ci sont très difficilement réalisables avec des marqueurs génétiques de type microsatellites (T. Giraud, communication personnelle). La centaine de mètres qui est donnée comme la distance de pollinisation par les insectes (Nilsson et al., 1992) est donc une distance moyenne qui ne présume pas d'événements de dispersion relativement rare mais à plus longue distance, cette estimation dans le cas des œillets étant difficilement réalisable. Si la probabilité d'une dispersion de pollen efficace (produisant des graines) est faible, il faut cependant considérer que les événements d'hybridation entre espèces du genre *Dianthus* par le biais des pollinisateurs sont possibles, bien qu'il soit indiqué qu'aucun événement d'hybridation n'ait été observé dans la nature entre l'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'introgression (*i.e.* de maintien) du transgène dans les populations sauvages. L'impact de cette introgression 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 sur le pourtour méditerranéen. On la trouve dans le sud de la France où elle ne semble pas particulièrement rare (<http://www.tela-botanica.org>) ; l'espèce n'est protégée que dans certains départements du nord-ouest (Normandie, Bretagne). Etant donnée le recouvrement entre l'aire de répartition de la forme sauvage et la région où l'œillet était cultivé dans les années 60, 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.

Comme l'attestent les données sur la production et la viabilité du pollen des œillets de la lignée FLO-40685-1, la dispersion du pollen produit par ces fleurs coupées reste difficile et de faible rendement nécessitant l'intervention d'un insecte pollinisateur (Tidke and Dharamkar, 2007) ou bien de l'homme (Gargano et al., 2009).

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 et qu'une fleur coupée en vase ne survit pas sur cette durée (expertise CNIH et URIH de Sophia Antipolis). Le pétitionnaire indique d'ailleurs que la dispersion des gènes par formation de graine est improbable et est soumise à la réussite de plusieurs événements successifs (arrivée de pollen viable sur les stigmates de l'œillet, germination du pollen, croissance du tube pollinique de l'ovule de l'œillet, etc.). 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., 2005a; Kim et al., 2005b). Si une pollinisation avait lieu dans des plants destinés à la commercialisation de fleurs coupées, elle augmenterait la production d'éthylène et accélérerait la sénescence de la fleur (Finger and Barbosa, 2006; Halevy, 1986). Compte tenu de ces éléments, la dispersion *via* des graines produites par les fleurs coupées semble donc improbable.

4.2 Avantage sélectif éventuel associé à la tolérance à certains herbicides

La forme mutée de l'acétolactase synthétase de tabac insérée dans la variété FLO-40685-1 (*SurB S4-Hra*) confère aux œillets une tolérance non seulement au chlorosulfuron (herbicide utilisé pour sélectionner les transformants) mais très probablement aux autres herbicides inhibiteurs de l'ALS. En effet, les données disponibles sur de nombreuses espèces indiquent que, parmi les trois mutations de ce gène, l'une est silencieuse et les deux autres permettent de contourner des inhibiteurs d'ALS par des voies différentes : la mutation Pro196Gln confère ainsi une tolérance à la famille des sulfonilurées tandis que la mutation Trp573Leu confère une tolérance à toutes les familles d'inhibiteurs de l'ALS (Heap, 2015).

Les inhibiteurs de l'ALS sont des herbicides utilisés en milieux agricoles. Ils n'entrent pas dans la composition des herbicides utilisés dans les jardins et les espaces verts. Il est donc peu probable que les plantes porteuses de la mutation *S4-Hra* suite à une éventuelle dissémination associée à la mise sur le marché des œillets FLO-40685-1 sous forme de fleurs coupées soient exposées à des herbicides auxquels elles seraient tolérantes.

En d'autres termes, il est peu probable que la protéine ALS mutée confère un avantage sélectif en cas de dissémination suite à la mise sur le marché des œillets FLO-40685-1.

5. Plan de surveillance post-commercialisation

En matière de surveillance post-commercialisation, la directive 2001/18/CE¹² (EC, 2001), complétée par les règlements (CE) 1829/2003 (EC, 2003a) et 1830/2003¹³ (EC, 2003b), prévoit que soient mis en place :

- un plan de surveillance spécifique, pour tester/confirmer d'éventuelles hypothèses émises lors de l'évaluation des risques pour l'environnement en ce qui concerne l'apparition et l'impact d'effets néfastes potentiels de l'OGM ou de son utilisation. Le plan de surveillance spécifique est destiné à mettre en évidence les changements prévisibles.
- un plan de surveillance générale, pour identifier l'apparition d'éventuels effets néfastes de l'OGM ou de son utilisation sur la santé humaine ou animale ou sur l'environnement qui n'auraient pas été anticipés lors de l'évaluation des risques pour l'environnement. Le plan de surveillance générale vise à mettre en évidence les changements non prévus par les plans de surveillance spécifique.

Considérant les résultats de l'analyse de risques présentée dans les chapitres précédents et l'utilisation prévue des œillets dans la demande d'autorisation de mise sur le marché C/NL/13/02, le CS du HCB s'accorde avec le pétitionnaire sur le fait qu'un plan de surveillance spécifique n'est pas nécessaire.

Le plan de surveillance générale proposé reprend ceux établis pour des œillets précédemment autorisés à l'importation (FLO-40689-6 ou Moonlite, autorisé en 2007, et FLO-40644-4 ou Moonqua, autorisé en 2009). Il repose sur des questionnaires remis aux importateurs, sur le

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

¹³ Le règlement (CE) 1830/2003 est un règlement du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant la traçabilité et l'étiquetage des organismes génétiquement modifiés et la traçabilité des produits destinés à l'alimentation humaine ou animale produits à partir d'organismes génétiquement modifiés, et modifiant la directive 2001/18/CE. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003R1830:FR:HTML>.

retour des consommateurs, des rapports de surveillance d'experts, et des courriers aux herbiers et jardins botaniques, auprès desquels il s'informe sur les collections d'œillets qui y arrivent. Le dossier précise qu'en 2013-2014, 243 requêtes ont été reçues par les herbiers et jardins botaniques et 74 réponses ont été émises concernant Moonlite et Moonqua. Sans plus de détails sur le contenu des informations échangées, on peut difficilement apprécier l'intérêt de ces enquêtes.

Deux experts ont été engagés par le pétitionnaire pour l'alerter en cas de détection de populations sauvages ou d'hybrides inhabituels d'œillets *Dianthus* au cours de leur surveillance du territoire. Ils doivent alors procéder à une analyse moléculaire des hybrides pour tester l'hypothèse d'hybridation avec les œillets FLO-40685-1. Au vu de la rémunération annuelle affichée (« moins de 1000 euros »), le CS s'interroge sur le travail que ces experts vont pouvoir effectivement réaliser, et quels territoires ils vont pouvoir effectivement surveiller. Les rapports des plans de surveillance des œillets Moonlite et Moonqua de 2014 comportent une analyse des stations suisse, grecque et albanaise. Le pétitionnaire indique qu'il tentera d'identifier d'autres experts pour analyser la situation en Italie et en France dans les années à venir.

Des revues de littérature, des recherches sur des sites web et des bases de données, ainsi que des communications sont annoncées par le pétitionnaire, de manière très générale et peu détaillée.

Enfin, bien que cela ne soit pas requis dans le cadre de la directive 2001/18/CE, une surveillance d'éventuelles repousses est également effectuée sur les sites de production en Amérique du Sud, particulièrement dans les tas de compostage formés par des résidus de culture d'œillets GM précédemment autorisés. Aucune repousse n'a été détectée.

Le pétitionnaire annonce l'établissement d'une base de données concernant toutes les exportations d'œillets GM vers l'UE (nombres, clients, dates et aéroport d'arrivée).

Concernant la traçabilité, une méthode de détection est fournie dans le dossier mais il n'est pas clair si elle a été validée. Une méthode se référant à FLO-40685-2 peut être retrouvée sur le site de l'EURL-GMFF¹⁴ (stade 5) ; elle correspond au lien indiqué dans le dossier. Une recherche avec le nom FLO-40685-1 n'apporte aucun résultat.

En matière d'étiquetage, le pétitionnaire propose de diffuser des instructions écrites aux distributeurs et d'apposer une mention spécifique sur les produits vendus. Les informations aux distributeurs, outre l'identification du produit, des restrictions commerciales et des coordonnées de la société Suntory Holdings Limited, porteront la mention : « Ce produit est un œillet génétiquement modifié qui n'est pas destiné à l'alimentation humaine et animale ni à la culture ». Cet étiquetage est réservé à l'amont de la filière, jusqu'aux grossistes, et n'est pas destiné aux fleuristes détaillants et consommateurs pour des raisons de faisabilité (ex : suivi de fleurs individuelles dans des bouquets composés).

¹⁴ Community Reference Laboratory for GM Food and Feed of the Joint Research Centre, Laboratoire de référence communautaire du Centre de recherche commun de la Commission Européenne, instauré par le règlement (CE) 1829/2003, appelé maintenant l'EURL-GMFF (European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed) :

http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-gmff.

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 la lignée d'œillet FLO-40685-1, 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 dissémination par des graines produites par ces fleurs est donc quasi nul.
- Le risque de dissémination 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 dissémination par bouturage est difficile à réaliser mais possible par des techniques adaptées.

Le plan de surveillance proposé par le pétitionnaire semble adapté à l'utilisation prévue des œillets FLO-40685-1 dans la demande d'autorisation de mise sur le marché C/NL/13/02. Le CS du HCB recommande toutefois que, si elle était autorisée, la mise sur le marché des œillets FLO-40685-1 soit accompagnée de mesures propres à répondre au risque de dissémination par bouturage par une communication à l'attention des sociétés d'amateurs quant aux possibilités de diffusion non contrôlée des œillets transgéniques.

7. Bibliographie

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

Broadhurst, C.L. (2001). Phytochemicals: The Ties That Bind. *Nutrition Science News* July 2001 issue.

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

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

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

EC (2001). Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. *Official Journal of the European Communities* L106, 1-36.

EC (2003a). Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. *Official Journal of the European Union* L268, 1-23.

EC (2003b). Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and

the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. Official Journal of the European Union L268, 24-28.

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

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

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

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

Heap, I. (2015). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. www.weedscience.com. Accessed July 29, 2015.

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

Hopp, T.P., and Woods, K.R. (1981). Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 3824-3828.

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

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

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

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

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

Martin, C., Zhang, Y., Tonelli, C., and Petroni, K. (2013). Plants, Diet, and Health. *Annual Review of Plant Biology*, Vol 64 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.

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

- Newhouse, K., Singh, B., Shaner, D., and Stidham, M. (1991). Mutations in corn (*Zea-mays* L) conferring resistance to imidazolinone herbicides. *Theor Appl Genet* 83, 65-70.
- Nilsson, L.A., Rabakonandrianina, E., and Pettersson, B. (1992). Exact tracking of pollen transfer and mating in plants. *Nature* 360, 666-668.
- Nimura, M., Kato, J., and Mii, M. (2006). Interspecific hybrid production by reciprocal crosses between *Dianthus caryophyllus* L. and *Dianthus x isensis* Hirahata et Kitamura. *J Horticult Sci Biotechnol* 81, 995-1001.
- Nimura, M., Kato, J., Mii, M., and Ohishi, K. (2008). Cross-compatibility and the polyploidy of progenies in reciprocal backcrosses between diploid carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) and its amphidiploid with *Dianthus japonicus* Thunb. *Sci Hortic* 115, 183-189.
- Pourrat, H., Bastide, P., Dorier, P., and Tronche, P. (1967). Préparation et activité thérapeutique de quelques glycosides d'anthocyanes. *Chim Thérap*, 33-38.
- Ray, T.B. (1984). Site of action of chlorsulfuron - inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plant Physiol* 75, 827-831.
- Shaner, D.L., Anderson, P.C., and Stidham, M.A. (1984). Imidazolinones - potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol* 76, 545-546.
- Southan, M.D., and Copeland, L. (1996). Physical and kinetic properties of acetohydroxyacid synthase from wheat leaves. *Physiol Plant* 98, 824-832.
- 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. (1990). Properties of mutant acetolactate synthases resistant to triazolopyrimidine sulfonanilide. *Plant Physiol* 94, 239-244.
- Tan, S.Y., Evans, R.R., Dahmer, M.L., Singh, B.K., and Shaner, D.L. (2005). Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manage Sci* 61, 246-257.
- Thomas, L.M., Gonsalves, S., Mandal, T., and Roychowdhury, N. (2003). Effect of different media on rooting of cuttings of carnation cv. Mixed Super Chaubaud. *Journal of Interacademia* 7, 262-264.
- Tidke, J.A., and Dharamkar, R.O. (2007). A Study on some aspects of pollination biology of winter ornamental plants. In *Advances in pollen spore research*, S.R.A. J., ed. (New Delhi, India, Today & Tomorrow's Printers and Publishers), pp. 129-139.
- Tutin, T.G., and Walters, S.M. (1993). *Dianthus* L. In *Flora europaea*, T.G. Tutin, V.H. Heywood, N.A. Burges, D.H. Valentine, and D.M. Moore, eds. (Cambridge, Cambridge University Press), pp. 227-246.
- Wu, S. (2007). Introduction and Cultivation of *Dianthus* sp. *Journal of Northeast Forestry University* 35, 84-86.

Annexe 1 : Saisine

Courrier reçu le

26 MAI 2015



Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

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 et de la protection
des végétaux

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

251, rue de Vaugirard
75732 Paris cedex 15

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

20 MAI 2015

Paris, le

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

Références : 150519- saisine HCB - dossier C-NL-13-02

Affaire suivie par : Anne Grevet

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

courriel : anne.grevet@agriculture.gouv.fr

PJ : 1 CD

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 États membres qui sont consultés pour faire des commentaires, demander des informations complémentaires ou émettre des objections à la mise sur le marché. En cas d'objections des États membres à la mise sur le marché de l'OGM, la Commission consulte l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA).

Le dossier suivant, qui a fait l'objet d'un rapport d'évaluation des Pays-Bas, est en cours d'évaluation par l'AESA :

- dossier **C/NL/13/02**, concernant la mise sur le marché d'oeillets génétiquement modifiés, lignée **FLO-40685-1**, pour l'importation et la commercialisation de fleurs coupées.

Dans la perspective d'un vote des États membres sur ce dossier, 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 7 septembre 2015**.

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


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 en séance du 25 juin 2015¹⁵ 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, Florence Bellivier, Philippe Berny, Yves Bertheau, Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno Chauvel, François-Christophe Coléno, 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, Cédric Moreau de Bellaing, 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 Vilotte¹⁶.

Le dossier a été examiné par six experts rapporteurs sélectionnés pour leurs compétences dans les disciplines requises pour l'analyse du dossier : cinq membres du CS du HCB et un expert externe, Pierre Rougé, Professeur émérite de l'Université de Toulouse III.

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.

L'expert externe a rempli une déclaration publique d'intérêts et a certifié n'avoir aucun conflit d'intérêts avec le dossier concerné. Il a fourni une analyse du dossier dans son domaine d'expertise. Il n'a toutefois pas contribué directement à la rédaction de cet avis, qui reste de la responsabilité du CS du HCB.

¹⁵ Membres du CS présents et représentés lors de la discussion du projet d'avis en séance du 25 juin 2015 : Claude Bagnis, Avner Bar Hen, Yves Bertheau, Elie Dassa, Hubert De Verneuil, Claudine Franche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Bernard Klonjkowski, Valérie Le Corre, Olivier Lemaire, Eliane Meurs, Nadia Naffakh, Didier Nègre, Sergio Ochatt, Jean-Christophe Pagès, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Jean-Luc Vilotte.

¹⁶ Composition du CS en vigueur suite au décret de nomination des membres du HCB du 30 décembre 2014.