

Résumé de l'évaluation des risques effectuée conformément au *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement*
Trichoderma longibrachiatum RM4-100
RSN 6823

Le présent document vise à expliquer la décision réglementaire prise en septembre 1997 en vertu de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (LCPE 1988)¹ concernant la fabrication ou l'importation de *Trichoderma longibrachiatum* RM4-100 par Iogen Corporation dans une installation étanche, à Ottawa.

Les renseignements pertinents concernant *T. longibrachiatum* RM4-100 ont été fournis conformément au paragraphe 29.11(4) du *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles* (RRSN) de la LCPE 1988.

La Direction des substances nouvelles d'Environnement Canada et le Bureau de l'évaluation et du contrôle des substances nouvelles de Santé Canada ont évalué l'information soumise par Iogen Corporation ainsi que d'autres données scientifiques disponibles en vue de déterminer si *T. longibrachiatum* RM4-100 est *toxique*² ou pourrait devenir *toxique* au sens de l'article 11 de la LCPE 1988.

Décision réglementaire :

En tenant compte des questions de danger et d'exposition, l'évaluation des risques d'Environnement Canada et de Santé Canada a déterminé que *Trichoderma longibrachiatum* RM4-100 n'est pas considéré comme *toxique*² pour l'environnement ou la santé humaine au Canada au sens de l'article 11 de la LCPE 1988.

Par conséquent, la fabrication ou l'importation de *T. longibrachiatum* RM4-100 dans une installation étanche pour utilisation dans une installation étanche ou pour exportation uniquement sont autorisées après le 18 septembre 1997.

Cette évaluation ne comprend pas d'évaluation des risques pour la santé humaine dans un environnement professionnel ni de l'exposition possible et des risques pour la santé humaine associés à l'utilisation de l'organisme dans un produit assujetti à la *Loi sur les aliments et drogues* ou en tant qu'élément d'un produit assujetti.

¹ Une nouvelle *Loi canadienne sur la protection de l'environnement*, 1999 a été introduite en 1999.

² Conformément à l'article 11 de la LCPE 1988, est toxique toute substance qui pénètre ou peut pénétrer dans l'environnement en une quantité ou concentration ou dans des conditions de nature à : a) avoir, immédiatement ou à long terme, un effet nocif sur l'environnement ou sur la diversité biologique; b) mettre en danger l'environnement essentiel pour la vie; c) constituer un danger au Canada pour la vie ou la santé humaines.

Annexe du RRSN: XVI (un micro-organisme fabriqué ou importé dans une installation étanche et non destiné à être introduit à l'extérieur d'une installation étanche ou destiné uniquement à l'exportation)³

Identification de l'organisme : *Trichoderma longibrachiatum* RM4-100

Déclarant: Iogen Corporation, 310 ch. Hunt Club est, Ottawa (Ontario) K1V 1C1
Canada

Date de la décision: 18 septembre 1997

Utilisation proposée: Production commerciale, dans une installation étanche, d'une nouvelle xylanase thermophile par la souche génétiquement modifiée *Trichoderma longibrachiatum* RM4-100.

Historique de la souche/modification génétique :

La souche RM4-100 est dérivée d'un mutant auxotrophe de la souche parentale M2C38⁴. La souche M2C38 a été génétiquement modifiée pour hyperproduire une xylanase thermophile modifiée par introduction balistique d'un vecteur de transformation pC/XHML-TV. La cassette d'expression comprend le gène structural modifié de la xylanase II (*xln2*) de *T. reesei* régulé par des séquences de *T. reesei*. La cassette de sélection contient un gène de résistance à un antibiotique régulé par des séquences de *T. reesei*. La souche parentale M2C38 est dérivée de la souche RUTC30 (ATCC 56765), un dérivé mutagène de la souche sauvage QM6a de *T. reesei* (ATCC 13631) qui a été isolée aux îles Salomon au cours de la Seconde Guerre mondiale à partir de toile de coton (Kuhls *et al.*, 1996).

Examen des dangers :

En plus de l'information soumise par le déclarant, un examen du matériel de référence interne et une recherche exhaustive des ouvrages scientifiques ont été effectués afin de réunir l'information concernant les effets potentiellement nuisibles pour la santé humaine et pour l'environnement attribuables à *T. reesei*.

Les espèces de *Trichoderma* sont des champignons saprophytes imparfaits, aérobies et mésophiles, métaboliquement polyvalents, qui sont retrouvées couramment dans le sol (Nevalainen *et al.*, 1994). Les espèces de *Trichoderma* se différencient principalement par le profil des ramifications des conidiophores et la morphologie des conidies.

³ Les dispositions relatives aux organismes contenues dans la partie II.1 du RRSN sont maintenant contenues dans le RRSN (organismes). Ces dispositions sont entrées en vigueur le 31 octobre 2005 et comprennent des modifications à la numérotation des annexes. Dans le RRSN (organismes), l'annexe XVI est devenue l'annexe 2.

⁴ Il y a divergence dans la désignation taxonomique de l'organisme. Dans la déclaration, la souche parentale a été nommée *Trichoderma longibrachiatum* Rifai, souche M2C38. La recherche des synonymes a indiqué que *Trichoderma reesei* est le nom le plus couramment utilisé. La classification de l'American Type Culture Collection de la souche parentale est basée sur la croissance des colonies et sur des caractéristiques morphologiques. Après consultation d'experts en taxonomie fongique dans le but de clarifier la désignation de la souche, il a été convenu, lors d'une réunion avec le déclarant, Environnement Canada et Santé Canada, que l'organisme déclaré est une souche de *Trichoderma reesei*.

En général, la fabrication industrielle à grande échelle de préparations enzymatiques de *T. reesei* se révèle sans danger dans de nombreuses industries, notamment dans la transformation de l'amidon et des aliments pour animaux, la fabrication d'alcool à partir de grains, le maltage et le brassage, l'extraction des jus de fruits et de légumes, l'industrie des pâtes et papiers ainsi que l'industrie textile (Hjortkjaer *et al.*, 1986). Les espèces de *Trichoderma* peuvent être tenues pour organismes-hôtes sécuritaires conformément aux critères mentionnés dans les lignes directrices de l'Organisation de coopération et de développement économiques intitulées *Recombinant DNA Safety Considerations* (OCDE, 1986) ainsi que dans la directive 90/219/EEC du conseil des communautés européennes (CCE) sur l'utilisation des micro-organismes génétiquement modifiés en installation étanche (CCE, 1990).

Il a été démontré que *T. reesei* est non pathogène et non toxique pour les animaux de laboratoire en bonne santé (Hjortkjaer *et al.*, 1986). Rien n'indique que *T. reesei* soit un pathogène absolu des végétaux ou des animaux, y compris les humains. Toutefois, cette espèce peut se comporter comme un pathogène opportuniste chez les animaux immunodéprimés dans des conditions expérimentales extrêmes (Hjortkjaer *et al.*, 1986). Certaines espèces de *Trichoderma* ont été signalées comme de rares et nouveaux pathogènes fongiques (Munoz *et al.*, 1997; Jacobs *et al.*, 1992; Seguin *et al.*, 1995).

Certaines espèces du genre *Trichoderma* peuvent être utilisées comme agents de lutte biologique en agriculture puisqu'elles peuvent avoir une action antagoniste contre plusieurs champignons phytopathogènes. Certaines espèces de *Trichoderma* peuvent également produire des toxines dans certaines conditions; cependant, l'expérience pratique d'utilisation de *T. reesei* indique qu'il est peu probable que cette espèce soit toxinogène (Hjortkjaer *et al.*, 1986). Des tests effectués sur des préparations enzymatiques commerciales confirment qu'aucune substance antibiotique ou inhibitrice n'est produite pendant la croissance des souches industrielles de *T. reesei* (Hjortkjaer *et al.*, 1986). Un produit de l'enzyme carbohydrase fabriqué par le déclarant à l'aide de la souche parentale M2C38 a donné des résultats négatifs au test de mesure d'aflatoxine.

L'utilisation d'un gène de résistance à un antibiotique comme marqueur de sélection dans la souche RM4-100 est requise pour la distinguer de la souche parentale M2C38. Le marqueur de sélection ne confère pas de résistance aux antibiotiques utilisés en clinique et il n'est pas susceptible de présenter un risque pour la santé.

Trichoderma reesei est classifié comme organisme de niveau de biosécurité 1 par l'American Type Culture Collection (ATCC). De plus, *T. reesei* a été désigné comme organisme du groupe de risque 1 par le Bureau de la sécurité des laboratoires de l'Agence de la santé publique du Canada.

Les fragments d'ADN utilisés dans la construction du vecteur de transformation sont bien caractérisés et ne contiennent aucun grand fragment non défini. Le gène de résistance à l'ampicilline utilisé dans la construction du vecteur de transformation est régulé par un promoteur bactérien qui n'est pas fonctionnel chez *T. reesei*. De plus, il a été démontré que l'ADN du vecteur s'est intégré de façon stable au chromosome sans perte ni réarrangement de séquence, et ce, même après plusieurs générations sur des milieux non sélectifs. Par conséquent, la possibilité de transfert latéral de gènes de cet organisme aux humains, aux animaux ou à d'autres micro-organismes dans l'environnement est extrêmement faible.

Les modifications génétiques utilisées pour obtenir la souche RM4-100 ne soulèvent pas de préoccupations quant à la modification de sa virulence ou de sa pathogénicité pour les humains, les animaux et les végétaux ou quant à ses dangers pour l'environnement. Le matériel génétique introduit est bien caractérisé et n'a pas d'effets pathogène ou toxique. Le phénotype résultant de la modification est bien caractérisé et n'est pas susceptible d'influencer le comportement normal de la souche.

Examen des aspects liés à l'exposition :

Les espèces de *Trichoderma*, dont *T. reesei*, sont des champignons saprophytes courants dans le sol, sont retrouvées dans les sols de toutes les régions climatiques et sont particulièrement répandues dans la litière des forêts mixtes et humides de feuillus (Nevalainen *et al.*, 1994).

La souche RM4-100 est fabriquée uniquement comme intermédiaire dans la production d'une nouvelle xylanase II thermophile dans une installation étanche. Le déclarant a indiqué que le procédé de fabrication répond aux normes du niveau d'étanchéité des *Good Large Scale Practices* (GLSP) telles que décrites à l'annexe K du document des National Institutes of Health des États-Unis intitulé *Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules* (NIH, 1994). La souche déclarée n'est pas destinée à être disséminée à l'extérieur de l'installation étanche. Par conséquent, la probabilité d'exposition de l'environnement et de la population en général est faible.

Le déclarant décrit les procédures visant à restreindre l'exposition potentielle des travailleurs. Celles-ci comprennent entre autres le port d'un équipement de protection (des masques respiratoires avec filtres à particules, des visières ou des lunettes de sécurité avec protecteurs latéraux, des gants de caoutchouc, des sarraus ou des combinaisons) approuvé par le National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) pour les travailleurs exposés de façon chronique aux poussières ou aérosols d'enzymes au cours d'opérations comme les repiquages ou la préparation des bouillons de fermentation.

Des précautions sont en place et utilisées par le déclarant afin d'assurer que les gaz d'échappement et les aérosols émanant du fermenteur sont décontaminés par rayonnement UV et au moyen d'un système de cyclone avec épurateur. Le fermenteur est équipé d'un système d'alarme activé en cas de pression élevée, de débordement de mousse ou d'un bas niveau. Le fermenteur est aussi entouré d'une digue en cas de déversement important.

Lorsque la production d'un lot d'enzyme est terminée, l'amas de cellules utilisées est inactivé chimiquement à l'aide d'un composé d'ammonium quaternaire, puis expédié dans un site d'enfouissement ou de compostage enregistré en conformité avec la réglementation provinciale. La désinfection chimique à l'aide de ces composés entraîne une réduction de la biomasse de 99.999%. Étant donné que la souche RM4-100 n'est pas dangereuse en soi, la probabilité de dommages importants pour l'environnement ou la santé humaine découlant de cette voie d'exposition sera minime.

Références :

- CCE. 1990. Directive 90/219/EEC du conseil, relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés. Journal officiel n° L 117 du 08/05/1990 p. 0001 - 0014.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31990L0219:FR:HTML>
- Hjortkjaer, R.K., Bille-Hansen, V., Hazelden, K.P., McConville, M., McGregor, D.B., Cuthbert, J.A., Greenough, R.J., Chapman, E., Gardner, J.R. and Ashby, R. 1986. Safety evaluation of Celluclast®, an acid cellulase derived from *Trichoderma longibrachiatum*. Journal of Food and Chemical Toxicology. 24(1): 55-63.
- Jacobs, F., Byl, B., Bourgeois, N., Coremans-Pelseneer, J., Florquin, S., Depre, G., Van de Stadt, J., Adler, M., Gelin, M. and Thys, J.P. 1992. *Trichoderma viride* infection in a liver transplant recipient. Mycoses. 35(11-12):301-3.
- Kuhls, K., Lieckfeld, E., Samuels, G.J., Kovacs, W., Petrini, O., Gams, W., Borner, T. and Kubicek, C.P. 1996. Molecular Evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma longibrachiatum* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 93: 7755-7760.
- Munoz, F.M., Demmler, G.J., Travis, W. R., Ogden, A.K., Rossman, S.N. and Rinaldi, M.G. 1997. *Trichoderma longibrachiatum* infection in a pediatric patient with aplastic anemia. Journal of Clinical Microbiology. 35(2): 499-503.
- Nevalainen, H., Suominen, P. and Taimisto, K. 1994. Minireview on the safety of *Trichoderma longibrachiatum*. Journal of Biotechnology. 37: 193-200.
- NIH. 1994. NIH Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules -Appendix K, US Department of Health and Human Services, in the Federal Register (United States), Vol. 59, No. 127.
- Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). 1986. Recombinant DNA Safety Considerations: Safety Considerations for Industrial, Agricultural and Environmental Applications of Organisms Derived by Recombinant DNA Techniques.
<http://www.oecd.org/dataoecd/45/54/1943773.pdf>
- Seguin, P., Degeilh, B., Grulois, I., Gacouin, A., Maugendre, S., Dufour, T., Dupont, B. and Camus, C. 1995. Successful treatment of a brain abscess due to *Trichoderma longibrachiatum* after surgical resection. European Jo biology and Infectious Diseases. 14(5):445-8.