

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, 1999*
***Trichoderma reesei* P345A**
RSN 13912

Le présent document vise à expliquer la décision réglementaire prise en vertu de la Partie 6 de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement, 1999* (LCPE 1999) concernant la fabrication ou l'importation de *Trichoderma reesei* P345A par Iogen Corporation dans une installation étanche, à Ottawa.

Les renseignements pertinents concernant *T. reesei* P345A ont été fournis conformément au paragraphe 29.11(4) du *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles* (RRSN) de la LCPE 1999.

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 et d'autres données scientifiques disponibles en vue de déterminer si *T. reesei* P345A est *toxique*¹ ou pourrait devenir *toxique* au sens de l'article 64 de la LCPE 1999.

Décision réglementaire :

En tenant compte des questions de danger et d'exposition et d'après l'évaluation des risques, Environnement Canada et Santé Canada ont déterminé que *Trichoderma reesei* P345A n'est pas considéré comme *toxique*¹ pour l'environnement ou la santé humaine au Canada au sens de l'article 64 de la LCPE (1999).

La fabrication et l'importation de *T. reesei* P345A dans une installation étanche pour utilisation dans une installation étanche ou pour exportation uniquement sont autorisées après le 22 juin 2005.

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 assujéti à la *Loi sur les aliments et drogues* ou en tant qu'élément d'un produit assujéti.

1 Conformément à l'article 64 de la LCPE 1999, 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)²

Identification de l'organisme : *Trichoderma reesei* P345A

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

Date de la décision: 22 juin 2005

Utilisation proposée: Production commerciale, dans une installation étanche, d'une enzyme xylanase II thermophile/alcalinophile par la souche génétiquement modifiée *Trichoderma reesei* P345A.

Historique de la souche/modification génétique :

Trichoderma reesei P345A est dérivé d'un mutant auxotrophe de la souche parentale M2C38 par l'introduction du vecteur de transformation linéaire pc/xHTX47a-TV. La cassette de sélection utilisée dans la construction du vecteur de transformation contient un gène de *Neurospora crassa* servant de marqueur de sélection. La cassette d'expression est composée d'une copie de la version modifiée du gène structural de la xylanase II (*xln2*), qui produit une nouvelle xylanase thermophile/alcalinophile de *T. reesei* et qui est régulé par des séquences *T. reesei*. La souche M2C38 (ATCC 74252) est dérivée de la souche RUTC30 (ATCC 56765) de *T. reesei*, un dérivé mutagène de la souche fondatrice QM6a (ATCC 13631) qui a été isolée aux Iles 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, on a procédé à un examen du matériel de référence interne et à une recherche exhaustive des ouvrages scientifiques 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. Les espèces de *Trichoderma* sont répandues dans la nature, croissent rapidement, sont faciles à cultiver et peuvent produire de grandes quantités de conidies sur une longue période (Manczinger et al., 2002).

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,

² 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.

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 (Fleming *et al.*, 2002). La souche parentale M2C38, qui est utilisée depuis 1991, n'a jamais été associée à une infection chez les humains.

Bien que certaines espèces du genre *Trichoderma* puissent être utilisées comme agents de lutte biologique dans l'agriculture puisqu'elles peuvent produire des composés antifongiques contre plusieurs champignons phytopathogènes, *T. reesei* P345A n'est pas un tel agent. 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 toxigène (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).

Dans un contexte industriel, des réactions allergiques aux carbohydrases ont déjà été signalées. Les xylanases, comme les autres carbohydrases, peuvent également se comporter comme des allergènes. Des études de toxicité ont démontré qu'une administration orale de xylanases natives d'*Aspergillus* et de *Thermomyces* n'engendre aucun effet nocif chez les rats et les souris (Pederson and Broadmeadow, 2000). Les xylanases natives n'ont montré aucun effet mutagène lors de test de mutation inverse chez *Salmonella typhimurium*. De plus, elles n'ont pas causé d'aberration chromosomique dans les cultures de lymphocytes humains (Pederson and Broadmeadow, 2000).

Des réactions allergiques à la souche *T. reesei* M2C38 ont déjà été signalées chez des travailleurs, mais l'utilisation d'un équipement de protection individuel approprié, comme des ventilateurs personnels, élimine en grande partie le problème. Le déclarant a indiqué que l'enzyme déclarée ne contient aucune trace de composés antifongiques ou de métaux lourds.

Aucun rapport n'indique que *N. crassa*, la source fongique du gène de sélection utilisé dans la construction du vecteur de transformation, soit un pathogène absolu. Le produit génique de *N. crassa* facilite la sélection de la souche *T. reesei* P345A d'un mélange d'autres microorganismes et il est peu probable qu'il présente un danger pour l'environnement étant donné qu'il a de nombreux équivalents fonctionnels chez la plupart des organismes vivants.

Trichoderma reesei et *N. crassa* sont tous deux classifiés comme organismes de niveau de biosécurité 1 par l'American Type Culture Collection. 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 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. Des données fournies par le déclarant montrent qu'au moins une partie du gène de résistance à l'ampicilline produisant une β -lactamase s'est intégrée dans le chromosome de la souche P345A. Par contre, 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 vecteur 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 gène de cet organisme aux humains, aux animaux ou à d'autres micro-organismes dans l'environnement est extrêmement faible.

La modification génétique de l'enzyme native résulte en une meilleure thermostabilité et en un pH optimal supérieur de la nouvelle xylanase. Les modifications génétiques utilisées pour obtenir *T. reesei* P345A 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 phénotype résultant de la modification est bien caractérisé et n'est pas susceptible d'influencer le comportement normal de *T. reesei*.

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).

T. reesei P345A est fabriqué uniquement comme intermédiaire dans la production d'une xylanase II modifiée 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, 2002). 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 pour détruire tous les organismes et au moyen d'un système de cyclone avec épurateur qui élimine les produits volatils et les odeurs. 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. Comme *T. reesei* P345A n'est pas dangereux en soi, une dissémination accidentelle à partir de l'installation de fabrication ne devrait pas présenter de risque grave pour l'environnement et la santé humaine.

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 ce composé entraîne une réduction de la biomasse de 99.999%. Des études en laboratoire sur la survie de *T. reesei* indiquent qu'il peut survivre dans des conditions climatiques froides (Providenti *et al.*, 2004). Étant donné que *T. reesei* P345A n'est ni pathogène ni toxique, on prévoit que 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>
- Fleming, R. V., Walsh, T.J. and Anaissie, E.J. 2002. Emerging and less common fungal pathogens. Infectious Clinic Diseases of North America. 16(4): 915-933.
- 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 reesei*. Journal of Food and Chemical Toxicology. 24(1): 55-63.
- 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 reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 93: 7755-7760.
- Manczinger, L., Antal, Z. and Kredics, L. 2002. Ecophysiology and breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains (a review). Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 49(1): 1-14.
- NIH. 2002. Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules -Appendix K, Department of Health and Human Services, National Institutes of Health. http://www4.od.nih.gov/oba/rac/guidelines_02/NIH_Guidelines_Apr_02.htm#_Toc7261552
- Nevalainen, H., Suominen, P. and Taimisto, K. 1994. Minireview on the safety of *Trichoderma reesei*. Journal of Biotechnology. 37: 193-200.
- 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>
- Pedersen, P.B. and Broadmeadow, A. 2000. Toxicological studies on *Thermomyces lanuginosus* xylanase expressed by *Fusarium venenatum*, intended for use in food. Food Additives and Contaminants. 17(9): 739-747.
- Pico Y., Fernandez, M., Rodriguez, R., Almudever, J., Manes, J., Font, G., Marin, R., Carda, C., Manzanares, P. and D. Ramon. 1999. Toxicological assessment of recombinant xylanase X₂₂ in wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47:1597-1602.
- Providenti, M.A., Mautner, I.S., Chaudhry, O., Bombardier, M., Scroggins, R., Gregorich, E. and Smith, M.L. 2004. Determining the environmental fate of a filamentous fungi, *Trichoderma reesei*, in laboratory-contained intact soil-core microcosms

using competitive PCR and viability plating. Canadian Journal of Microbiology.
50: 623-631.