

**Résumé de l'évaluation des risques réalisée en vertu du
Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles (organismes)
Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999)
NSN 17140 : souche P1640A de *Trichoderma***

Décision réglementaire

En vertu de la partie 6 de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (1999) [(LCPE 1999)] et de son *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles (organismes)* [RRSN (O)], le ministre de l'Environnement et le ministre de la Santé ont évalué les renseignements concernant l'organisme déclaré et ont déterminé qu'il n'est pas soupçonné d'être nocif pour l'environnement canadien ni pour la santé humaine aux termes de l'article 64 de la LCPE (1999)¹, lorsqu'il est fabriqué dans une installation étanche. Par conséquent, la fabrication de la souche P1640A de *Trichoderma* à cette fin est permise après le 3 mars 2013.

Annexe du

RRSN (O) :

2 (microorganismes fabriqués ou importés à une installation étanche qui ne sont pas destinés à être introduits à l'extérieur de cette installation ou qui sont destinés uniquement à l'exportation).

Identification de

l'organisme :

souche P1640A de *Trichoderma*

Déclarant :

Novozymes Canada, 300 chemin Hunt Club, Ottawa (Ontario) K1V 1C1

Date de la décision :

3 mars 2013

Utilisation proposée : Production d'un mélange de cellulases et d'hémicellulases comprenant la xylanase HTX47A.

IDENTIFICATION / HISTORIQUE DE LA SOUCHE / MODIFICATIONS GÉNÉTIQUES

La souche P1640A de *Trichoderma* est un dérivé génétiquement modifié d'une souche de *Trichoderma* dont la souche parentale M2C38 (ATCC 74252) figure sur la Liste intérieure de substances (LIS). Toutes ces souches sont issues de la souche sauvage de *Trichoderma* isolée des Îles Salomon. La souche P1640A a été identifiée d'après la morphologie des colonies et des spores, ainsi que par des analyses génotypiques. Le déclarant a montré que la croissance, la sporulation et les propriétés des hyphes de la souche P1640A sont semblables à celles de toutes ses souches ancestrales. La souche P1640A de *Trichoderma* forme des colonies vertes et minces, faisant environ 30 mm de diamètre, avec des conidiophores en petits fascicules ou touffes. Elle se distingue de ses prédécesseurs par sa capacité unique de croître sur milieu sélectif minimal et

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 humaine.

de produire une xylanase HTX47A modifiée. Son identification a été confirmée par l'analyse de la séquence des régions ITS1, ITS2 et *tef1* avec la méthode de diagnostic moléculaire des codes-barres disponible en ligne, TrichoKey (Druzhinina et coll., 2005). La comparaison des séquences ITS1, ITS2 et *tef1a* faite à l'interne n'a révélé aucun lien de parenté de la souche P1640A avec les souches du clade/agrégat de *T. longibrachiatum* et les autres espèces apparentées comme *T. harzianum*, *T. koningii* et *T. viride*, lesquelles ont été identifiées comme des agents étiologiques d'infections chez des patients immunodéprimés et les personnes sensibles, en raison de leur capacité de croître à 37 °C et à pH neutre (Kredics et coll., 2003; Druzhinina et coll., 2012).

La souche P1640A a été mise au point par une série de modifications génétiques et de processus de sélection visant la production de grandes quantités de xylanase HTX47A. L'historique de la souche P1640 de *Trichoderma* explique le détail des manipulations faites à partir de la souche parentale jusqu'à l'obtention de la souche P1640A. Avec sa filiation directe, ses antécédents d'utilisation, la constance de ses caractéristiques de morphologie, de croissance et de reproduction, avec la confirmation de l'identification à l'aide des caractéristiques morphologiques et des analyses génotypiques, l'identification taxonomique a été jugée adéquate pour l'évaluation des risques.

EXAMEN DES DANGERS

Danger environnemental

Les espèces du genre *Trichoderma* sont des saprophytes courants du sol, particulièrement abondants dans la litière des forêts humides de feuillus mélangés (Eveleigh, 1985). Ce sont des champignons imparfaits, aérobies, mésophiles, polyvalents sur le plan métabolique, communs à toutes les zones climatiques (Nevalainen, 1994). Comme la souche sauvage est utilisée pour la production d'hémicellulase au Japon depuis les années 1960 (Toyama, 1969), les grandes capacités cellulolytiques des *Trichoderma* sont bien connues.

Aucun danger potentiel pour l'environnement n'a été signalé pour la souche parentale et la souche M2C38 (ATCC 74252). S'il est vrai que dans des conditions environnementales extrêmes (p. ex. inoculation de fortes doses de spores viables) certaines espèces de *Trichoderma* peuvent agir comme des pathogènes animaux opportunistes (Hjortkjaer et coll., 1986), les évaluations de risques précédentes réalisées pour de nombreuses souches de *Trichoderma* produites par le déclarant, dont les caractéristiques phénotypiques étaient semblables à celles de la souche P1640A, ont toutes permis de conclure qu'il y avait peu d'éléments donnant à penser que l'une ou l'autre de ces souches pouvaient être pathogènes, toxinogènes, mutagènes ou qu'elles pourraient présenter un danger pour les animaux ou les végétaux en bonne santé. Même sans antécédents d'utilisation sécuritaire pour la souche P1640A en tant qu'organisme de production, on sait que la plupart des souches de production industrielle de *Trichoderma* sont utilisées sans danger depuis longtemps dans de nombreuses industries (Hjortkjaer et coll., 1986). On ne s'attend pas à ce que les modifications ayant donné naissance à la souche P1640A, y compris la transformation avec différents vecteurs bien définis et la présence d'un marqueur génique de sélection provenant d'une source non pathogène, modifient le risque de danger environnemental associé à la souche P1640A par rapport à celui de la souche parentale.

Par conséquent, le risque que l'organisme déclaré ou son matériel génétique cause des effets indésirables sur l'environnement, la préservation de celui-ci ou sa diversité biologique est considéré comme faible.

Danger pour la santé humaine

La souche déclarée (souche P1640A de *Trichoderma*) est un champignon génétiquement modifié dont la filiation peut être remontée jusqu'à la souche parentale sauvage des Îles Salomon. Le déclarant a fourni la séquence complète de l'ADN des gènes qui ont été insérés et intégrés de manière stable dans le génome de la souche P1640A ainsi que la séquence des acides aminés qu'ils codent. Les recherches dans la littérature scientifique sur les éléments génétiques en question n'ont révélé aucun risque d'effet nocif sur la santé des humains.

Une revue de littérature interne n'a révélé aucun signalement d'effets nuisibles de cette espèce de *Trichoderma* pour l'humain. Néanmoins, l'espèce est connue pour sa production de cellulases et d'hémicellulases, des enzymes qui peuvent agir comme sensibilisants. Ce phénomène a en effet été documenté dans des cas de dermatite, de rhinite et d'asthme résultant de l'exposition à des préparations commerciales d'enzymes (Halprin et coll., 1973; Hytonen et coll., 1994; Ransom et Schuster, 1981; Tarvainen et coll., 1991) de même que dans des cas de détresse respiratoire retardée chez des employés affectés à l'entretien d'une usine de fabrication de pâtes et papiers à partir de copeaux de bois (Cohn et coll., 1984). La sensibilisation à la xylanase, aussi produite par des espèces de *Trichoderma*, a été signalée chez des employés de boulangerie et d'établissements de fabrication d'aliments pour animaux d'élevage (Vanhanen et coll., 1996; Vanhanen et coll., 2001; Elms et coll., 2003).

Outre les cas d'hypersensibilité associés à une exposition professionnelle répétée et prolongée aux enzymes produites par *Trichoderma*, l'organisme n'est pas considéré comme pathogène pour l'humain. Pour cette raison et étant donné que l'organisme ne sera cultivé que dans une installation étanche, une exemption visant les données sur la sensibilité aux antifongiques a été accordée. Il faut toutefois noter que la plupart des espèces du genre *Trichoderma*, dont l'espèce déclarée, sont sensibles aux produits suivants : amphotéricine B, fluconazole, itraconazole, kétoconazole et miconazole (Kredics et coll., 2003). Il existe des antifongiques dans le cas peu probable d'une infection résultant d'une exposition accidentelle. Même s'il ne s'agit que d'une faible probabilité, la présence d'un marqueur de sélection dans le génome de la souche déclarée pourrait être préoccupante pour la santé humaine si l'organisme ou le gène était rejeté en grande quantité dans l'environnement.

L'utilisation de la souche P1640A de *Trichoderma* ne devrait pas avoir d'effet nocif sur la population générale. Le risque pour la santé humaine est considéré comme faible.

EXAMEN DES ASPECTS LIÉS À L'EXPOSITION

La souche P1640A de *Trichoderma* ne sera produite que dans une installation étanche où le procédé de fabrication satisfait aux normes des bonnes pratiques d'exploitation à grande échelle (Good Large Scale Practice) définies à l'annexe K des lignes directrices des NIH sur la recherche effectuée avec des molécules d'ADN recombiné (US NIH Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules – NIH Guidelines).

La seule utilisation prévue de la souche P1640A est la production d'un mélange de cellulases et d'hémicellulases contenant une xylanase modifiée. La souche ne sera ni vendue ni autrement distribuée au Canada ou ailleurs dans le monde. Les déchets liquides, gazeux et solides contenant la souche P1640A de *Trichoderma* seront traités de manière à tuer les cellules vivantes du champignon, et des mesures d'intervention en cas d'urgence sont en place en cas de déversement accidentel. Des procédures de confinement et d'inactivation sont en place pour empêcher ou réduire au minimum tout rejet de l'organisme des installations.

Les risques d'exposition environnementale et humaine à la souche P1640A de *Trichoderma* sont donc considérés comme faibles.

CONCLUSION DE L'ÉVALUATION DES RISQUES / DÉCISION RÉGLEMENTAIRE

En se basant sur les considérations ci-dessus liées aux dangers et à l'exposition, Environnement Canada et Santé Canada ont conclu dans leur évaluation des risques que la souche P1640A de *Trichoderma* ne devrait pas causer d'effet nocif sur l'environnement ou la santé humaine au Canada, conformément à l'article 64 de la LCPE (1999).

Selon cette évaluation des risques aux termes de l'annexe 2 du RRSN (organismes), la substance n'est pas admissible à l'ajout à la Liste intérieure des substances.

RÉFÉRENCES

Veillez noter que cette liste de références est partielle pour des raisons de confidentialité.

- Cohn, KK, Marcero, D.H., and Wojinski, S.F. (1984). The use of *GCIMS* analysis and fungal culturing in a pulp mill industrial hygiene program. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 45, 594-597.
- Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G., Komon, M., Bissett, J., Szakacs, G., and Kubicek, C.P. (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics Biol.* 42, 813-828.
- Druzhinina, I.S., Komon-Zelazowska, M., Ismaiel A, Jaklitsch W, Mullaw T, Samuels GJ, Kubicek CPo (2012) Molecular phylogeny and species delimitation in the section *Longibrachiatum* of *Trichoderma*. *Fungal Genetics Biol.* 49 (5), 358-368.
- Elms, J., Fishwick, D., Walker, J., Rawbone, R., Jeffrey, P., Griffm, P., Gibson, M., and Curran, A.D. (2003). Prevalence of sensitisation to cellulase and xylanase in bakery workers. *Occup. Environ. Med.* 60, 802-804.
- Eveleigh, D. E. *Trichoderma*. In: *Biology of industrial microorganisms*. Demain A.L. and N.A. Solomon (eds). 1985. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., Menlo Park, CA, pp. 487-509.

- Halprin, G.M., Buckley, C.E., Zitt, M.J., and McMahon, S.M. (1973). Changes in arteriovenous complement activity induced by inhalation challenge. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 108, 343-352.
- Hjortkjaer, R.K., Bille-Hansen, V., Hazelden, K.P., McConville, M., McGregor, D.B., Cuthbert, I.A., Greenough, R.J., Chapman, E., Gardner, J.R., and Ashby, R. (1986). Safety evaluation of celluc1ast®, an acid cellulase derived from *Trichoderma reesei*. *Food and Chemical Toxicology* 24, 55-63.
- Hytonen, M., Vanhanen, M., Keskinen, H., Tuoni, T., Tupasela, O., and Nordman, H. (1994). Pharyngeal edema caused by occupational exposure to cellulase enzyme. *ALLERGY EUR. J. Allergy Clin. Immunol.* 49, 782-784.
- Kredics, L., Antal, Z., Dóczy, I., Manczinger, L., Kevei, F., and Nagy, E. (2003). Clinical importance of the genus *Trichoderma*: A review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 50, 105-117.
- Nevalainen, H. (1994). On the safety of *Trichoderma reesei*. *Journal of Food Protection* 37 193-200.
- Ransom, J.H., and Schuster, M. (1981). Allergic reactions to enzymes used in plant cloning experiments. *J. Allergy Clin. Immunol.* 67, 412-415.
- Tarvainen, K., Kanerva, L., Tupasela, O., Grenquist-Norden, B., Jolanki, R., Estlander, T., and Keskinen, H. (1991). Allergy from cellulase and xylanase enzymes. *Clin. Exp. Allergy* 21, 609-615.
- Toyama, N. Applications of cellulases in Japan. *Advances in Chemistry, Series 95.* 1969. In: Gould, R. (Ed.), *Cellulases and Their Application.*, American Chemical Society, Washington, D.C., 359-390.
- Vanhanen, M., Tuomi, T., Hokkanen, H., Tupasela, O., Tuomainen, A., Holmberg, P.C., Leisola, M., and Nordman, H. (1996). Enzyme exposure and enzyme sensitisation in the baking industry. *Occup. Environ. Med.* 53, 670-676.
- Vanhanen, M., Tuomi, T., Tiikkainen, U., Tupasela, O., Tuomainen, A., Luukkonen, R., and Nordman, H. (2001). Sensitisation to enzymes in the animal feed industry. *Occup. Environ. Med.* 58, 119-123.