

Le directeur général délégué
du Pôle Sciences pour l'expertise

Maisons-Alfort, le 9 juin 2022

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relatif à une demande de dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés (OGM) dans le cadre d'un essai clinique d'un médicament vétérinaire

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 26 avril 2022 par l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (ANMV), conformément à l'article L533-3-3 du Code de l'Environnement, pour la réalisation de l'expertise suivante : demande d'avis sur la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés (OGM) dans le cadre d'un essai clinique d'un médicament vétérinaire (Référence ANMV 21-463).

Depuis le 1^{er} janvier 2022, conformément à l'ordonnance n°2021-1325 du 13 octobre 2021 et au décret n°2021-1905 du 30 décembre 2021, l'Anses reprend les missions du Haut Conseil des Biotechnologies (HCB) concernant l'évaluation des risques pour l'environnement et la santé publique de l'ensemble des utilisations de biotechnologies en milieu ouvert, qu'il s'agisse de plantes, d'animaux, de micro-organismes, ou de médicaments.

Les conclusions et recommandations de l'Anses relatives à cette évaluation sont transmises aux autorités compétentes en charge de l'autorisation et de la gestion des demandes portant sur de telles utilisations.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Conformément aux articles R533-8 et R533-22 du Code de l'environnement, l'ANMV – au sein de l'Anses – agit en tant qu'autorité compétente française pour les procédures d'autorisation de dissémination volontaire d'un médicament vétérinaire de type OGM dans l'environnement à des fins d'expérimentations. Aussi, l'ANMV saisit l'Anses pour une évaluation des risques pour l'environnement et la santé publique.

Dans ce cadre, la demande, objet d'un présent avis, concerne la mise en place d'un essai clinique pour l'utilisation d'un médicament vétérinaire contenant un OGM. Ce médicament vétérinaire a déjà fait l'objet d'une autorisation de dissémination volontaire à des fins d'expérimentations aux Etats-Unis (Alabama, Georgie et Caroline du Sud), en administration *in ovo* et sous-cutanée, sur un total de 64 189 poussins. Une analyse de risque de ce produit vétérinaire a été approuvée par le *Center for Veterinary Biologics* du Département de l'Agriculture des Etats-Unis en juin 2020.

Cette demande porte sur un essai de ce médicament vétérinaire contenant un OGM en administration *in ovo*, chez l'œuf embryonné de poule de 18 à 19 jours d'âge, en France.

Les articles 5 à 11 de la directive 2001/18/CE, relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement, s'appliquent à l'évaluation de cette demande.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été réalisée par le Groupe de Travail (GT) « Biotechnologie » réuni le 20 mai 2022, sur la base de rapports initiaux rédigés par deux rapporteurs. Elle a été conduite en se basant sur la directive 2001/18/CE, les documents guides de la Commission Européenne et de l'Agence européenne du médicament (EMA, 1997 et 2005, et Commission, 2017), ainsi que sur les éléments complémentaires jugés nécessaires par les rapporteurs et les experts du GT « Biotechnologie » et précisés dans l'avis.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet : <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT « BIOTECHNOLOGIE »

3.1. Introduction

Le médicament vétérinaire contenant un OGM évalué dans le cadre de cette demande est un vaccin trivalent recombinant visant à prévenir la mortalité, réduire les signes cliniques et les lésions causés par les virus de la maladie de Marek (MD), de la bursite infectieuse (IBD) ou maladie de Gumboro, et de la maladie de Newcastle (ND).

La maladie de Marek de la poule est due à un herpesvirus alpha (du genre *Mardivirus*), agent causal d'une prolifération tumorale des cellules lymphoïdes d'un grand nombre d'organes et de tissus, il peut aussi induire une polynévrite¹. La maladie concerne surtout les animaux à « vie économique longue » (poulets « label », poules pondeuses et reproducteurs), elle apparaît chez les animaux âgés de 10 à 20 semaines. C'est une maladie présente dans le monde entier, qui a un impact majeur dans la production avicole intensive depuis les années 1960. Les pertes économiques peuvent être importantes pour les éleveurs avec des épisodes aigus pouvant affecter 70% des animaux d'un groupe de volailles. Parmi les 3 sérotypes du virus de la maladie de Marek, seul le sérotype 1 (*Gallid alphaherpesvirus 2*) est pathogène chez le poulet.

Trois types de vaccins conventionnels contre la maladie de Marek ont été développés à partir des sérotypes 3 (*Maleagrid alphaherpesvirus 1* ou herpesvirus de la dinde ou HVT), 2 (*Gallid alphaherpesvirus 3*), et plus récemment à partir d'une souche atténuée du sérotype 1, CVI988.

Dans le monde, la quasi-totalité des poules pondeuses et des volailles reproductrices est aujourd'hui vaccinée contre la maladie de Marek avec la souche CVI988, seule ou en association avec les 2 autres vaccins. Mais l'efficacité vaccinale contre les souches circulantes les plus virulentes n'est pas complète.

La maladie de Gumboro, ou bursite infectieuse, est une maladie virale aviaire causée par le virus *Infectious Bursal Disease virus* (IBDV), virus à ARN double brin qui possède un génome bi-segmenté et qui appartient au genre *Avibirnavirus* de la famille des *Birnaviridae*. La capside de ce virus non enveloppé est composée de trimères de la protéine VP2. Cette protéine de structure est la cible d'anticorps neutralisants. La maladie de Gumboro peut conduire à une immunosuppression qui augmente la sensibilité à d'autres maladies et peut interférer avec les réponses vaccinales. Le taux de mortalité peut être élevé.

La maladie de Newcastle est une maladie infectieuse épizootique, très contagieuse des oiseaux de toutes espèces, due à un paramyxovirus aviaire de type 1 virulent. Son importance réside dans la morbidité et la mortalité élevées qu'elle peut causer dans les élevages avicoles touchés par les souches les plus virulentes et sa rapidité de propagation induisant des pertes économiques considérables. La maladie fait l'objet selon les pays et les espèces, d'un plan de surveillance ou d'une vaccination (obligatoire ou facultative) avec des vaccins vivants. En Europe, elle est signalée régulièrement, notamment sous la forme de paramyxovirose du pigeon chez les colombiformes captifs et sauvages. Les élevages en plein air de volailles sont donc constamment menacés. La période d'incubation est d'environ 21 jours, les signes cliniques varient beaucoup et les poulets y sont très sensibles ; ils sont difficiles à distinguer de l'influenza aviaire. La maladie peut induire de l'apathie et de la prostration avec une respiration accélérée, d'éventuels signes digestifs et des troubles nerveux. La transmission

¹ Inflammation du système nerveux central entraînant des lésions des nerfs périphériques

peut être directe par des contacts rapprochés entre individus ou indirects par aérosol, par les fientes, les œufs et tout matériel contaminé.

3.2. Informations concernant l'OGM

Le médicament vétérinaire contenant un OGM, nommé ci-après « vaccin », évalué dans le cadre de cette demande, est composé d'une préparation de cellules infectées par une souche recombinante de l'herpèsvirus de la dinde (souche HVT FC-126). Cette souche est génétiquement modifiée pour exprimer le gène *VP2* de la souche Faragher F52-70 du virus de la bursite infectieuse (IBDV) et le gène *F* de la souche lentogène D26-76 du virus de la maladie de Newcastle (NDV), afin de stimuler la réponse immunitaire contre les MDV, IBDV et NDV. La souche virale génétiquement modifiée obtenue est ainsi dénommée HVT-IBD-ND.

3.2.1. Caractéristiques de l'organisme parental

La souche de l'herpèsvirus de la dinde HVT est utilisée depuis près de quarante ans pour la vaccination contre la maladie de Marek (Schat et Nair, 2013). Elle est également déjà autorisée depuis 2017 chez les poulets de chair, en tant que vecteur pour l'expression du *VP2* de IBDV ainsi que du gène *F* du virus de la maladie de Newcastle² (souche HVP360 du HVT), sans qu'aucun impact négatif sur l'environnement ou la santé humaine n'ait été déclaré à ce jour.

La souche HVT est apathogène et endémique, son spectre d'hôte se limite aux espèces aviaires (la dinde est son hôte naturel, la souche HVT peut aussi se répliquer chez les poulets et autres Galliformes : canards, cailles), elle ne se réplique pas chez les mammifères. La souche HVT ne provoque aucune maladie clinique chez les poulets et sa propagation par contact est rare.

La souche HVT peut se propager par la libération de particules de poussière des follicules de plumes. En effet, elle se réplique de façon limitée et transitoire et produit des particules virales acellulaires infectieuses dans les cellules épithéliales du follicule plumeux, ces cellules épithéliales se détachent sous forme de squames dans l'environnement. Toutefois, les études de sécurité réalisées avec la souche parentale HVT ont montré que cette dernière a un faible taux de survie dans les squames des poulets vaccinés sous forme acellulaire : la souche reste viable jusqu'à 5 heures mais est indétectable à 8 heures à 25-30°C. Sous forme cellulaire, elle peut cependant être détecté jusqu'à 11 jours.

La séquence du génome de la souche HVT FC-126 est caractérisée (Afonso et al., 2001 ; GenBank accession number NC_002641.1, souche FC-126). Cette souche est génétiquement stable.

L'infection de cellules d'embryons de poulets (*chicken embryo fibroblasts, CEF*) par la souche HVT FC-126, qui induit un effet cytopathique observable macroscopiquement, suivie d'un immunomarquage anti-HVT, permet la détection et le titrage de la souche avec une haute sensibilité (Li et al., 2011 ; Smietanka et al., 2019).

La pétitionnaire mentionne que la souche HVT induit une infection persistante chez les poulets et peut être détectée pendant toute la vie de l'animal.

² Vaccin vétérinaire Innovax-ND-IBD, autorisé sur le marché depuis 2017 en Europe pour une immunisation active des poussins de 1 jour ou des œufs embryonnés de 18-19 jours, en prévention contre la maladie de Newcastle, la maladie de la bursite infectieuse et la maladie de Marek (EU/2/17/213/001-002).

3.2.2. Caractéristiques des vecteurs

Deux plasmides *pUC* sont utilisés pour la construction de la souche virale génétiquement modifiée HVT-IBD-ND, afin d'introduire chacune des cassettes d'expression du gène *VP2* de IBDV et du gène *F* de NDV dans le génome HVT. Pour la production de chacun des plasmides, les séquences codantes de *F* et *VP2* sont obtenues par synthèse chimique de gène, puis sont amplifiées par PCR³ et les fragments ensuite obtenus sont clonés dans des plasmides de transfert.

Les deux cassettes d'expression sont insérées séquentiellement dans le génome de la souche HVT FC-126 par recombinaison homologe après transfection des deux plasmides de transfert dans des cellules CEF infectées par HVT.

La protéine *VP2* du virus de la bursite infectieuse est une protéine de structure, cible de la réponse neutralisante de l'hôte. Elle n'est pas impliquée dans la pathogénicité de la souche Faragher F52-70 de IBD. La cassette d'expression de *VP2* est sous le contrôle des séquences régulatrices du promoteur du gène *IE* du CMV humain et du signal de polyadénylation du gène de l'hormone de croissance bovine.

La souche lentogène D26-76 du virus de la maladie de Newcastle est peu virulente et induit des signes cliniques légers. La glycoprotéine *F* du virus de la maladie de Newcastle est une protéine de fusion transmembranaire impliquée dans l'entrée du virus et la formation du syncytium. La protéine *F* est un antigène protecteur majeur contre la maladie de Newcastle. La cassette d'expression de *F* est sous le contrôle des séquences régulatrices du promoteur du gène *IE* du CMV murin et du signal de polyadénylation du SV40.

Le pétitionnaire indique une substitution en position 506 d'une Phe pour une Val au niveau du cadre de lecture ouvert de *F*, par rapport à la séquence génétique de la souche D26-76.

Bien que cette substitution ne se retrouve pas au niveau du site de clivage du gène *F* associé à la pathogénicité de la souche NDV (positions 111 à 117), et bien qu'il ne soit pas attendu par le pétitionnaire que cette substitution affecte le caractère lentogène de la séquence du gène *F*, considérant que la séquence codante de *F* est obtenue par synthèse chimique de gène, le GT « Biotechnologie » demande à ce que le pétitionnaire argumente l'origine de cette substitution.

3.2.3. Caractéristiques de l'organisme génétiquement modifié

Les gènes *F* et *VP2* sont insérés au niveau de régions non codantes du génome HVT (entre UL35 et UL36 pour le gène *VP2* et entre UL55 et le gène 3 pour le gène *F*). La précision des insertions dans le génome HVT a été vérifiée par une analyse PCR.

Des analyses par Western Blot ont permis de vérifier l'expression des deux inserts et des analyses par immunofluorescence ont permis de confirmer l'expression des trois antigènes cibles de la souche recombinante HVT-IBD-ND.

Les données de séquençage couvrent 84,78 % du génome de HVT-IBD-ND, incluant les deux inserts et les régions flanquantes des sites d'insertion de ces derniers dans le génome de la souche virale HVT.

Le GT « Biotechnologie » demande à ce que le pétitionnaire précise à quelle étape de la production de la souche GM HVT-IBD-ND le séquençage a été réalisé.

³ PCR (Polymerase Chain Reaction) : Réaction en chaîne par polymérase

Afin d'analyser toute potentielle insertion non-cible de séquence de vecteur plasmidique dans le génome HVT qui aurait pu se produire lors des recombinaisons homologues, le GT « Biotechnologie » souhaite qu'un séquençage complet du génome soit réalisé à l'étape finale de la production de la souche GM.

La souche génétiquement modifiée HVT-IBD-ND ne contient pas de marqueurs de sélection tels que des gènes de résistance aux antibiotiques.

La souche HVT-IBD-ND n'a pas montré de réversion vers la virulence. La souche virale est non pathogène. Elle ne se réplique pas chez les mammifères mais seulement chez les Galliformes.

Le tropisme et les conditions de dissémination de la souche GM HVT-IBD-ND, via des particules de poussière des follicules de plumes et les phanères, sont identiques à ceux de la souche virale parentale HVT.

La stabilité génétique de la souche vaccinale a été évaluée *in vitro* et *in vivo* au cours de cinq passages successifs. Le dossier ne présente que la vérification de la séquence des deux inserts après cinq passages en cellules CEF.

Le GT « Biotechnologie » demande à ce que le pétitionnaire confirme la stabilité génétique de la souche HVT-IBD-ND en fournissant les données de séquence complète de cette souche après cinq passages en cellules CEF ou d'une autre étude permettant de confirmer sa stabilité. Le GT « Biotechnologie » estime que pour pouvoir confirmer la sécurité d'utilisation de cette souche GM, ce séquençage complet est nécessaire.

3.3. Informations sur les conditions de dissémination et l'environnement récepteur

3.3.1. Informations sur la dissémination

L'essai clinique présenté vise à évaluer, sur le terrain, l'innocuité et l'efficacité du vaccin injecté *in ovo*, chez l'œuf embryonné de 18-19 jours d'âge. La posologie est une injection unique de 0,05 mL par œuf.

Ce vaccin est composé de la substance active suivante : préparation virale associée aux cellules CEF contenant la souche recombinante HVT du sérotype 3 du virus de la maladie de Marek exprimant la protéine VP2 d'IBDV et la protéine F de NDV (plusieurs valeurs sont indiquées par le pétitionnaire, dont ≥ 3115 UFP⁴ ; approximativement 4000-11000 UFP). Le vaccin est congelé en ampoule de verre dans de l'azote liquide.

Le GT « Biotechnologie » demande à ce que la dose administrée exprimée en UFP/œuf soit précisée par le pétitionnaire pour le lot de vaccin utilisé au cours de cet essai.

Le début de l'immunité apportée par le vaccin est de 6 jours après la vaccination *in ovo* et la durée de l'immunité couvre toute la période à risque pour la maladie de Marek. Pour la bursite infectieuse, le début de l'immunité est à 18 jours et dure jusqu'à 63 jours d'âge. Enfin, pour la maladie de Newcastle, le début de l'immunité est à 21 jours et dure jusqu'à 63 jours d'âge.

Dans le cadre de la présente demande, les essais seront réalisés dans des élevages de poulets de chair en France. Après éclosion au couvoir, les poussins seront mis en élevage dans des bâtiments fermés, pour une durée de 5 à 8 semaines (animaux à croissance rapide) avant d'être transportés à l'abattoir. Ils seront destinés à la consommation humaine après transformation (sauf les carcasses qui auraient été éliminées pour les raisons suivantes : cachexie, tumeur, fièvre, carcasses sombres...).

⁴ UFP : Unités formant plaque (de lyse)

Il est prévu qu'un groupe témoin positif soit vacciné également *in ovo*, avec un vaccin équivalent HVT-IBD-ND et autorisé sur le marché européen.

Le pétitionnaire envisage de vacciner entre 14 000 et 86 000 œufs pour les deux groupes (testé et témoin), pour mettre en élevage entre 10 000 et 72 000 poussins par groupe. S'il écloit un nombre excédentaire de poussins, ils seront abattus selon les pratiques standards. Les deux groupes feront l'objet d'une surveillance, d'un transport et d'un élevage séparé, ils seront évalués à l'aveugle sur les paramètres suivants : poids, mortalité, pathologie brute des tissus, histologie, signes cliniques, et caractéristiques de production.

L'injection *in ovo* se fera à l'aide d'un dispositif automatique utilisé dans les couvoirs. Le personnel habilité pour le suivi de l'essai suivra les principes généraux d'hygiène et prendra des précautions particulières lors de la manipulation de litière de poulet vacciné. Le personnel devra également être particulièrement vigilant lors de la manipulation des ampoules de vaccin conservées dans l'azote liquide et porter un équipement de protection individuel. La décongélation des ampoules contenant le vaccin se fait dans un bain à 25-30°C, le contenu est ensuite mélangé à un diluant.

Les pratiques d'élevage standard seront suivies. Seules les personnes habilitées seront autorisées à rentrer dans les bâtiments où se déroulera l'étude, en respectant les protocoles spécifiques (pédiluves, tenue adaptée...).

Concernant le nettoyage et la désinfection des bâtiments, les procédures standard pour la production de volailles commerciales seront suivies, incluant le dépeuplement complet du poulailler, le retrait complet du fumier et de la litière usagée, le lavage à haute pression de toutes les surfaces et la désinfection avec un agent approprié à large spectre.

3.3.2. Informations sur l'environnement (à la fois sur le site même et sur l'environnement plus étendu)

L'essai terrain concernera deux couvoirs en France, l'un dans Les Côtes-d'Armor, l'autre en Vendée. Deux élevages et un ou deux abattoirs sont également présélectionnés. Ces derniers seront localisés en dehors de zones urbaines à forte densité de population et de toute zone protégée, sensible sur le plan environnemental (protection de biotopes, réserves ornithologiques, habitats d'espèces migratrices, réserves en eau potable), ou de zones de production intensive d'autres animaux destinés à l'alimentation.

Dans les élevages, les poulets seront maintenus en intérieur dans des installations biosécurisées conformes à la réglementation locale, dans un environnement clos.

3.4. Informations sur les interactions entre les OGM et l'environnement

3.4.1. Caractéristiques affectant la survie, la multiplication et la dissémination

La viabilité de la souche vaccinale a été estimée expérimentalement à 5 à 8 heures sous forme acellulaire à 25°C ou 30°C. Les virus à ADN enveloppés ont une faible viabilité dans l'environnement.

La présence de virus a été recherchée dans les poussières des enclos hébergeant des poulets vaccinés *in ovo* avec le vaccin HVT-IBD-ND, collectées à 11 et 22 jours après éclosion. Seuls les prélèvements réalisés 11 jours après éclosion étaient positifs pour l'antigène viral associé au vaccin HVT-IBD-ND. Ce délai correspond à la durée de vie du virus parental HVT sous forme cellulaire. Après 22 jours, aucun virus vivant n'a pu être isolé de ces poussières.

Concernant la dissémination de la souche virale GM dans l'environnement, une étude réalisée à partir de poulets vaccinés *in ovo* avec 19 413 UFP de la souche HVT-IBD-ND a permis de montrer l'absence de transmission de la souche vaccinale à des poulets sentinelles.

Une étude similaire a mis en évidence la transmission de la souche vaccinale GM à une dinde sentinelle. Dans cette étude, 7 jours après éclosion, des poussins vaccinés *in ovo* ont été mis en contact avec des dindes non vaccinées. 15 jours après cette exposition, un échantillon sanguin d'une de ces six dindes était positif pour l'antigène viral associé au vaccin HVT-IBD-ND. Cependant, cinq semaines après, toutes les dindes ont été testées négatives.

La souche vaccinale GM n'a pas d'avantage sélectif par rapport à la souche parentale puisque les gènes *F* et *VP2* ont été insérés au niveau de régions non codantes du génome HVT, et que les protéines *F* et *VP2* n'apportent pas de caractéristiques associées à l'infectivité, la survie ou la multiplication du virus.

3.4.2. Interactions avec l'environnement

L'administration du vaccin sera réalisée *in ovo*, et les poulets seront élevés dans un bâtiment clos. L'interaction avec l'environnement extérieur sera donc très limitée.

Considérant que la capacité de la souche vaccinale GM à survivre dans l'environnement est très limitée, le risque de dissémination par la poussière contaminée lors du nettoyage des poulaillers ou par l'air évacué est jugé faible et non préoccupant. De plus, considérant que le virus est apathogène, le risque associé à la transmission à d'autres gallinacés est estimé comme faible et non préoccupant. Des études menées par le pétitionnaire chez les dindes, faisans, canards, et cailles et consistant en une mise en contact de ces derniers avec des poulets vaccinés ou directement en une administration en sous-cutanée du vaccin chez ces espèces suivi d'une surveillance des éventuels signes cliniques confirment ces conclusions et montrent que la souche vaccinale GM est non préoccupante pour ces gallinacés.

La souche vaccinale HVT-IBD-ND ne se répliquant pas chez les mammifères, le risque associé à son exposition à des mammifères qui pourraient avoir accès accidentellement aux bâtiments est considéré comme négligeable et peu préoccupant.

3.5. Informations sur les plans de surveillance, de contrôle, de traitement des déchets et d'intervention d'urgence

3.5.1. Techniques de surveillance

Les méthodes de détection de la souche virale HVT-IBD-ND et des antigènes exprimés après infection de cellules CEF s'appuient sur le marquage par immunofluorescence. La sensibilité de la technique est élevée car elle permet de détecter chaque plage virale infectée.

Des analyses par Western Blot à l'aide d'anticorps polyclonaux spécifiques de *VP2* ou de *NDV* ou des PCR en temps réel avec des amorces décrites par le pétitionnaire permettent également la détection de la souche virale HVT-IBD-ND.

Durant l'essai, les poulets issus des œufs vaccinés feront l'objet d'une surveillance quotidienne et tout effet indésirable sera signalé conformément aux procédures de pharmacovigilance encadrant cet essai.

3.5.2. Contraintes imposées à la dissémination

En tant que virus à ADN enveloppé, la souche virale GM HVT-IBD-ND est inactivée lorsqu'elle est exposée à la lumière du soleil, à la chaleur (> 25-30°C), au séchage, ou à des produits de désinfection (détergents, acides, alcool) (Lytle et Sagripanti, 2005 ; Schat et Nair, 2013 ; Tsujimura et al., 2015). De plus, cette souche est associée à des cellules CEF et elle ne peut survivre plus de 5 à 8 heures sous forme acellulaire.

La souche virale GM HVT-IBD-ND peut être inactivée par des désinfectants chimiques lors d'un traitement de 10 minutes (Schat et Nair, 2013). Les procédures de désinfection du dispositif automatique de vaccination et de tout autre matériel utilisé au couvoir pour la vaccination, ainsi que des surfaces de la zone de vaccination des bâtiments avec un agent désinfectant approprié à large spectre, prévues dans le protocole de l'essai permettent de maîtriser le risque de dissémination.

3.5.3. Traitement des déchets

Tous les flacons de vaccins ouverts restants et les matériaux jetables utilisés pendant l'essai (ampoules, seringues, aiguilles, contenants, résidus d'éclosion...) seront placés dans des conteneurs fermés, hermétiques et incassables et détruits conformément aux procédures de gestion des déchets médicaux. Les flacons de vaccins non utilisés et stockés dans les conditions requises seront renvoyés au pétitionnaire.

Le GT « Biotechnologie » demande à ce que l'élimination des déchets ayant été en contact avec la souche GM soit réalisée par une filière DASRI⁵ portant la mention « contient des OGM ».

Il est prévu que la litière usagée soit utilisée à des fins d'épandage sur des terres agricoles comme engrais.

Le GT « Biotechnologie » rappelle que l'épandage du fumier et de la litière usagée doit être réalisé après compostage (associé à une montée en température >30°C) de quelques semaines à quelques mois, selon les conditions météorologiques. Le GT « Biotechnologie » considère que le risque de dissémination de la souche virale vaccinale associé à l'épandage du fumier et de la litière usagée précédé d'un compostage est négligeable et non préoccupant.

Les coquilles d'œufs, les poussins et les poulets morts ou éliminés avant la fin de l'essai seront collectés par des sociétés d'équarrissage spécialisées. Dans l'éventualité d'un taux de mortalité des animaux vaccinés supérieur à la moyenne habituelle de l'élevage, il est prévu que les animaux soient examinés pour déterminer la cause de la mort. Les carcasses seront éliminées conformément aux réglementations locales.

Le GT « Biotechnologie » demande à ce qu'en fonction des résultats de l'autopsie, si une détection de la souche GM est observée, le pétitionnaire mette en œuvre une élimination des animaux morts en filière DASRI.

⁵ DASRI : Déchets d'Activités de Soins à Risques Infectieux

3.5.4. Plans d'intervention d'urgence

Si une ampoule se casse accidentellement (choc thermique par exemple), ou si la préparation vaccinale se renverse, une procédure de nettoyage et désinfection avec des désinfectants appropriés pour détruire chimiquement la souche virale HVT-IBD-ND est prévue et décrite par le pétitionnaire. Les matériaux utilisés pour le nettoyage seront également désinfectés.

3.6. Evaluation des risques environnementaux

3.6.1. Evaluation des risques pour la santé humaine

Le risque d'exposition humaine à la souche vaccinale HVT-IBD-ND sera limitée aux vétérinaires, techniciens, et exploitants des fermes où se dérouleront les essais.

Considérant (i) que la souche parentale HVT et les construits qui en dérivent ne peuvent pas se répliquer dans les cellules de mammifères d'après l'état de l'art des connaissances et (ii) que des études d'innocuité menées par le pétitionnaire chez la souris n'ont pas indiqué un quelconque potentiel de transmission de HVT-IBD-ND aux mammifères, **le GT « Biotechnologie » considère le risque associé à l'exposition des travailleurs à la souche vaccinale comme négligeable et non préoccupant.**

Concernant les risques liés à la consommation de viande provenant de poulets vaccinés, il a été démontré par le pétitionnaire qu'environ deux semaines avant l'abattage des animaux, aucun virus actif HVT-IBD-ND n'était détecté dans le sang. De plus, la température de cuisson des poulets pour la consommation humaine est largement supérieure à celle qui s'est avérée inactivante pour le virus (25-30°C).

Egalement, considérant que le virus est principalement localisé dans les lymphocytes associés aux organes viscéraux et follicules plumeux, et non dans les tissus principalement consommés par l'Homme, **le GT « Biotechnologie » considère le risque associé à la consommation de viande cuite provenant de poulets vaccinés comme négligeable et non préoccupant.**

3.6.2. Evaluation des risques pour l'environnement

La sécurité de l'administration *in ovo* d'une dose augmentée (10 fois la dose prévue pour la vaccination) de la souche vaccinale HVT-IBD-ND (65 139 UFP/œuf) a été mesurée avec un taux d'éclosabilité de 97 % et un taux de survie de 100 % (sur 60 poussins) 120 jours après l'éclosion.

Le profil de sécurité de l'administration sous-cutanée d'une dose augmentée (10 fois la dose prévue pour la vaccination) de la souche vaccinale HVT-IBD-ND à des souris, dindes, cailles, faisans, et canards est satisfaisant : taux d'éclosion $\geq 94,9\%$, pas de signes cliniques significatifs. La souche virale HVT-IBD-ND ne peut se répliquer que dans les cellules de Galliformes et non chez les mammifères. La transmission aux dindes est possible mais la souche vaccinale s'est avérée sûre et non pathogène chez ces dernières.

La souche vaccinale peut être libérée dans l'environnement à partir des follicules plumeux des poulets vaccinés, mais elle est associée à des cellules CEF et ne peut pas survivre plus de 5 à 8 heures sous forme acellulaire.

Le « GT Biotechnologie » considère que le protocole de désinfection prévu pour cet essai par le pétitionnaire devrait permettre d'éviter la dispersion des follicules plumeux.

Le GT « Biotechnologie » considère que le risque de dissémination de la souche virale vaccinale associé à l'épandage du fumier et de la litière usagée précédé d'un compostage est négligeable et non préoccupant.

Aucune recombinaison entre le HVT vaccinal et les sérotypes du virus de la maladie de Marek n'a jamais été rapportée, bien que la vaccination avec le HVT soit utilisée depuis 40 ans. De même, les combinaisons de vaccins HVT, de sérotype 2 ou 1 du virus de la maladie de Marek et de vaccins IBDV/NDV (trouvées dans des vaccins multivalents) se sont révélées sans risque de transmission dans des essais de terrain et évaluation des poulets. De plus, l'inhibition de la surinfection permet d'éviter l'infection de cellules déjà infectées par d'autres particules virales de la même espèce.

Le GT « Biotechnologie » considère le risque de recombinaison avec d'autres souches du virus de la maladie de Marek, du virus de la bursite infectieuse ou du virus de la maladie de Newcastle comme négligeable et non préoccupant.

3.6.3. Evaluation globale des risques

La souche GM HVT-IBD-ND est construite à partir du génome de la souche FC-126 de l'herpèsvirus de la dinde (HVT). HVT est un virus non pathogène dont le tropisme est restreint aux oiseaux et ne se répliquant pas chez l'hôte mammifère.

La souche GM HVT ne provoque pas de manifestations cliniques chez le poulet. Le risque de dissémination de HVT à partir de poulet est négligeable.

L'administration du vaccin est réalisée par injection *in ovo* ce qui permet une gestion satisfaisante du risque d'exposition globale à la souche vaccinale.

L'ensemble de ces données permet de garantir l'innocuité de l'administration en conditions expérimentales de la souche vaccinale aux poulets (espèce cible).

Toutefois, le GT « Biotechnologie » demande à ce que le pétitionnaire présente les résultats des essais réalisés en condition terrain aux Etats-Unis et précise la dose exprimée en UFP/œuf administrée de souche vaccinale HVT-IBD-ND.

3.7. Conclusions du GT « Biotechnologie »

La demande, objet du présent avis, concerne la mise en place d'un essai clinique pour l'utilisation d'un vaccin vétérinaire contenant un OGM. Ce vaccin a déjà fait l'objet d'une autorisation de dissémination volontaire à des fins d'expérimentations aux Etats-Unis (Alabama, Georgie et Caroline du Sud), en administration *in ovo* et sous-cutanée, sur un total de 64 189 poussins. Une analyse de risque de ce produit vétérinaire a été approuvée par le *Center for Veterinary Biologics* du Département de l'Agriculture des Etats-Unis en juin 2020.

Ce vaccin vétérinaire est composé d'une préparation de cellules infectées par une souche recombinante de l'herpèsvirus de la dinde (souche HVT FC-126). Cette souche est génétiquement modifiée pour exprimer le gène *VP2* de la souche Faragher F52-70 du virus de la bursite infectieuse (IBDV) et le gène *F* de la souche lentogène D26-76 du virus de la maladie de Newcastle, afin de stimuler la réponse immunitaire contre les MDV, IBDV et NDV. La souche virale génétiquement modifiée obtenue est ainsi dénommée HVT-IBD-ND.

Le GT « Biotechnologie » demande à ce que les informations complémentaires suivantes soient apportées par le pétitionnaire :

- la dose exprimée en UFP/œuf administrée pour le lot de vaccin utilisé au cours de cet essai ;
- l'origine de la substitution en position 506 d'une Phe pour une Val au niveau du cadre de lecture ouvert de *F* ;
- les données de séquençage complètes de la souche virale GM vaccinale HVT-IBD-ND issues de la phase finale de production et celles correspondant à l'analyse de la stabilité du génome après cinq passages en cellules CEF ;
- les résultats des essais réalisés en conditions terrain aux Etats-Unis et la dose exprimée en UFP/œuf administrée de souche vaccinale HVT-IBD-ND ;
- la mise en œuvre de l'élimination par une filière DASRI portant la mention « contient des OGM » des déchets ayant été en contact avec la souche GM et des animaux morts pour lesquels une autopsie viendrait confirmer la présence de la souche GM.

Concernant l'évaluation des risques associés à la dissémination volontaire d'OGM dans l'environnement dans le cadre de cette demande d'essai, le GT « Biotechnologie » formule les conclusions suivantes :

sur l'évaluation des risques pour l'environnement :

- le risque associé à la latence de la souche HVT-IBD-ND est géré par les conditions de réalisation de l'essai prévues par le pétitionnaire ;
- le protocole de désinfection prévu pour cet essai par le pétitionnaire devrait permettre d'éviter la dispersion des follicules plumeux ;
- le compostage puis l'épandage du fumier et de la litière usagés issus des essais permettent de considérer le risque de dissémination de la souche virale vaccinale associé à cet épandage comme négligeable et non préoccupant ;
- le risque de recombinaison avec d'autres souches du virus de la maladie de Marek, du virus de la bursite infectieuse ou du virus de la maladie de Newcastle est considéré comme négligeable et non préoccupant.

sur l'évaluation des risques pour la santé humaine :

- le risque associé à l'exposition des travailleurs à la souche vaccinale est négligeable et non préoccupant.
- le risque associé à la consommation de viande cuite provenant de poulets vaccinés est négligeable et non préoccupant.

En conclusion, bien que des données complémentaires soient attendues par le GT "Biotechnologie", ce dernier considère que les risques pour l'environnement et la santé humaine évalués dans le cadre de cette demande d'essai clinique sont négligeables et non préoccupants.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) endosse les conclusions du GT « Biotechnologie ». Les risques pour l'environnement et la santé publique dans le cadre de cet essai sont négligeables et non préoccupants.

Matthieu Schuler

MOTS-CLÉS

OGM, vaccin vétérinaire, HVT FC-126, maladie de Marek, Bursite Infectieuse, maladie de Gumboro, maladie de Newcastle, volailles, dissémination volontaire.

GMO, veterinary vaccine, HVT FC-126, Marek's disease, Gumboro disease, infectious bursal disease, Newcastle disease, poultry, deliberate release.

BIBLIOGRAPHIE

Afonso C.L., Tulman E.R., Lu Z., Zsak L., Rock D.L., Kutish G.F. (2001). The genome of Turkey Herpesvirus. *Journal of Virology*, 75(2), 971-978.

Commission Européenne. EudraLex – Volume 6. https://ec.europa.eu/health/medicinal-products/eudralex/eudralex-volume-6_en. Guidance on environmental risk assessment for veterinary medicinal products consisting of or containing genetically modified organisms (GMOs) as or in products (2017).

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 – JO L vol. 106 (2001)

European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for veterinary use. Guideline on live recombinant vector vaccines for veterinary use. 2005.

European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for veterinary use. Guideline on environmental risk assessment for immunological veterinary medicinal products. 1997.

Li Y., Reddy K., Reid S.M., Cox W.J., Brown I.H., Britton P., Nair V. and Iqbal M. (2011). Recombinant herpesvirus of turkeys as a vector-based vaccine against highly pathogenic H7N1 avian influenza and Marek's disease. *Vaccine*, 29(46), 8257-8266.

Lytle C.D. and Sagripanti J.-L. (2005). Predicted inactivation of viruses of relevance to biodefense by solar radiation. *Journal of Virology*, 79(22), 14244-14252.

Règlement (UE) 2019/6 du Parlement européen et du Conseil du 11 décembre 2018 relatif aux médicaments vétérinaires et abrogeant la directive 2001/82/CE – JO L 004 du 7.1.2019, p.43.

Schat K.A. and Nair V. (2013). Marek's Disease. In: Diseases of Poultry 13th ed.; David E. Swayne editor; Wiley-Blackwell Publishing, pp. 515-552.

Smietanka K., Tyborowska J., Olszewska-Tomczyk M., Domanska-Blicharz K., Minta Z., Rabalski L., Czarnota A., Kucharczyk K. and Szewczyk B. (2019). A recombinant Turkey Herpesvirus expressing F and HN genes of avian Avulavirus-1 (AAvV-1) genotype VI confers cross-protection against challenge with virulent AAvV-1 genotypes IV and VII in chickens. *Viruses*, 11(9), 784.

Tsujimura K., Murase H., Bannai H., Nemoto M., Yamanaka T. and Kondo T. (2015). Efficacy of five commercial disinfectants and one anionic surfactant against equine herpesvirus type 1. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(11), 1545-1548.

CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2022). Avis relatif à une demande de dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés (OGM) dans le cadre d'un essai clinique d'un médicament vétérinaire. Maisons-Alfort : Anses, 14 p.