

ANNEXE Ia :

## DONNÉES DE CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DES VÉGÉTAUX TRANSGÉNIQUES DESTINÉS À UNE DISSÉMINATION EN MILIEU OUVERT

### INTRODUCTION

En juillet 1998, des agents de réglementation de l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA), de Santé Canada (SC) et de l'Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) de l'United States Department of Agriculture (USDA) se sont réunis pour comparer, et harmoniser dans la mesure du possible, certains aspects de la caractérisation génétique moléculaire qui font partie intégrante de leurs mécanismes d'examen des végétaux transgéniques. La conclusion d'un accord sur des exigences communes et des méthodes d'analyse acceptables pour la caractérisation génétique moléculaire facilitera la présentation de données justificatives par des promoteurs qui cherchent à faire approuver, par la réglementation, l'intégration de ces végétaux dans la production ou le commerce agricole des deux pays. La présente annexe est l'un des fruits de cette réunion. Elle résume et détermine les ressemblances et les différences dans les éléments déterminants de la caractérisation génétique moléculaire des végétaux transgéniques étudiées au cours du processus d'examen par ces organismes participants. La caractérisation génétique moléculaire fait simplement partie de l'information examinée au cours des évaluations de ces végétaux effectuées avant leur commercialisation.

La portée du présent document se limite à l'examen du processus de transformation et des vecteurs utilisés au cours de la transformation ; du matériel génétique éventuellement transmis à la plante receveuse ; de la détermination, de l'hérédité, et de l'expression du matériel génétique dans la plante transgénique, ainsi que de la production de nouvelles protéines codées par le matériel génétique introduit. Le présent document ne porte pas sur certains types de techniques ni certaines pratiques d'assurance-qualité (p. ex., bonnes pratiques de laboratoire) utilisées pour produire des données de caractérisation génétique moléculaire.

Les organismes ont trouvé des points de convergence très substantiels dans les types de données de caractérisation génétique moléculaire qui doivent être présentées et examinées. Outre les séries de données examinées, les participants des deux pays ont réaffirmé que les examens sont encore effectués au cas par cas, ce qui a l'avantage de permettre d'examiner plus ou moins de données selon la nature du cas et les pouvoirs de réglementation de chaque organisme participant. L'utilisation du mot « peut » dans le présent document entend tenir compte d'une partie de cette latitude dans la détermination du moment propice où les séries de données seront jugées comme partie intégrante de toute la trousse de demande. Par conséquent, les consultations entre les organismes de réglementation et chaque demandeur sont considérées comme une partie importante du processus global de demande nécessaire pour faire ce genre de déterminations.

Les éléments essentiels de la caractérisation génétique moléculaire des végétaux transgéniques décrits plus bas s'appliquent au processus d'examen des organismes participants, tant au Canada qu'aux États-Unis, sauf avis contraire. Le contenu du présent document sera examiné et modifié au besoin par ces organismes. La version actuelle (V. 2) reflète des changements apportés à la suite de commentaires soumis par le Comité consultatif sur la biotechnologie agricole de l'Argentine (CONABIA) le 21 septembre 2000 et le 5 janvier 2001. Le glossaire qui suit donne la définition de certains termes dans le contexte du présent document.

## GLOSSAIRE

- ADN porteur** L'ADN utilisé pour accélérer la préparation ou la transformation du matériel génétique dans une plante, mais qui ne fait pas partie de la construction.
- région codante** Séquence d'ADN qui, une fois transcrite, contribue à la production de l'ARN mature, qui peut ou non être traduit pour produire une protéine. Les régions codantes peuvent comprendre des cadres de lecture ouverts complets ou tronqués (sauf des introns), qui pourront être traduits de façon à produire une protéine ou un peptide ou être modifiés intentionnellement de façon à demeurer intraduisibles, comme dans le cas des ribozymes ou des constructions antisens, par exemple.
- construction** Un fragment d'ADN génétiquement manipulé (p. ex., plasmide) qui contient, sans y être limité, des séquences d'ADN à intégrer dans le génome de la plante cible.
- citations de bases de données** Sources d'information publiquement accessible sur les séquences de nucléotides ou de protéines. Les quatre bases de données et leurs adresses de site Web couramment utilisées sont :

**GenBank** : Une collection annotée de toutes les séquences d'ADN publiquement accessibles, conservée par les National Institutes of Health (NIH) des États-Unis.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Genbank/index.html>

**Banque de données nippones sur l'ADN** : La banque d'ADN officiellement certifiée du Japon, qui recueille des séquences d'ADN des chercheurs.  
<http://www.ddbj.nig.ac.jp/fromddbj-e.html>

**Séquences de nucléotides du EMBL** : Une base de données sur des séquences d'ADN et d'ARN prélevées des publications scientifiques, des demandes de brevets et directement présentées par des chercheurs et des groupes de séquençage.

[http://www.ebi.ac.uk/ebi\\_docs/embl\\_db/ebi/topembl.html](http://www.ebi.ac.uk/ebi_docs/embl_db/ebi/topembl.html)

La **Banque de données sur les séquences de protéines SWISS-PROT** : Une base de données sur des séquences de protéines produites en collaboration par Amos Bairoch (Université de Genève) et l'EBL.

<http://www.ebi.ac.uk/~flang/sp/sp.html>

<b>insert</b>	Cette partie d'une construction (voir ci-dessus) qui est intégrée au génome de la plante receveuse.
<b>région non codante</b>	Des séquences d'ADN situées à l'extérieur d'un cadre ouvert de lecture et qui ne sont pas traduites pour devenir partie intégrante d'une protéine. Elles peuvent inclure des séquences d'ADN dont la fonction dans la plante ou dans d'autres hôtes est de réguler ou d'influencer l'expression ou la maturation moléculaire (processivité) de produits géniques (p. ex. les SAR [ <i>scaffold attachment regions</i> ou gènes régulateurs de l'attachement de la molécule d'ADN au squelette chromosomique], les promoteurs ou initiateurs, les séquences initiales, les amplificateurs, les introns et les terminateurs) ou pour faciliter la réplication, la transposition, la recombinaison ou la coupure de l'ADN (p. ex. les origines de la réplication, les séquences répétées d'éléments transposables, les bordures de l'ADN-T, les séquences <i>lox</i> , les lieurs, etc.). D'autres régions non codantes peuvent être des séquences n'ayant aucune fonction connue (p. ex. séquences du squelette plasmidique).
<b>stabilité</b>	L'aptitude du caractère transgénique à s'exprimer dans la lignée végétale transformée et les lignées végétales dont elles sont issues, d'une façon uniforme, fiable et prévisible.
<b>caractère(s)</b>	Le(s) caractère(s) phénotypique(s) conféré(s) à la plante receveuse par l'insert transgénique.
<b>vecteur</b>	Une molécule d'ADN en réplication autonome dans laquelle un ADN étranger est inséré et ensuite multiplié dans une cellule hôte.

# CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DES VÉGÉTAUX TRANSGÉNIQUES

## 1 LE SYSTÈME DE TRANSFORMATION

### 1.1 Description de la méthode de transformation

1.1.1 Décrire et fournir des références pour la méthode de transformation, p. ex., la transformation par *Agrobacterium* ou la transformation directe par des méthodes comme le bombardement de particules, l'électroporation, la transformation de protoplastes par du P.E.G., etc.

1.1.2 Pour ce qui est des méthodes de transformation directe, décrire la nature et la source de tout ADN porteur utilisé.

1.1.3 Pour la transformation par *Agrobacterium*, désigner la souche d'*Agrobacterium* utilisée au cours du processus de transformation et indiquer comment le vecteur du plasmide Ti a été désarmé, et si *Agrobacterium* a été évacué du tissu transformé.

1.1.4 Pour ce qui est des systèmes de transformation autres que par *Agrobacterium*, fournir l'information suivante :

1.1.4.1 Le système utilise-t-il un agent pathogène ou des séquences d'acides nucléiques d'un agent pathogène?

1.1.4.2 Comment les séquences liées à la pathogenèse ont-elles été extraites avant la transformation?

1.1.4.3 Le processus de transformation supposait-il l'utilisation de plasmides auxiliaires ou d'un mélange de plasmides? Dans l'affirmative, les décrire en détail.

1.2 Description du matériel génétique éventuellement transmis au matériel végétal receveur (la modification/les constructions).

1.2.1 Fournir un résumé de tous les éléments génétiques qui composent le vecteur, y compris des régions codantes et les séquences non codantes d'une fonction connue (voir par exemple le tableau 1). Pour chaque élément génétique, fournir une citation où ces séquences fonctionnelles ont été décrites, isolées et caractérisées (les citations de bases de données publiquement accessibles sont acceptables) et indiquer :

- 1.2.1.1 La portion insérée de la séquence complète, ainsi que sa taille.
- 1.2.1.2 Son emplacement, son ordre d'apparition et son orientation chez le vecteur.
- 1.2.1.3 Sa fonction chez la plante.
- 1.2.1.4 La source (le nom scientifique et commun, ou l'appellation commerciale, de l'organisme donneur).
- 1.2.1.5 Si l'élément génétique est responsable d'une maladie ou d'une lésion chez des végétaux ou d'autres organismes, et s'il s'agit d'un produit toxique, allergène, pathogène ou irritant.
- 1.2.1.6 Si l'organisme donneur est responsable de toute maladie ou lésion chez des végétaux ou d'autres organismes, et s'il produit des toxines, des allergènes ou des irritants, ou s'il est apparenté à des organismes qui en sont responsables.
- 1.2.1.7 S'il existe des antécédents d'utilisation sans risque de l'organisme d'origine ou de ses éléments.
- 1.2.2 S'il s'est produit une modification importante qui touche la séquence des acides aminés des gènes destinés à s'exprimer chez la plante, donner la citation. Si la séquence des acides aminés modifiée n'a pas été publiée, donner la séquence au complet en soulignant les modifications. Les modifications qui ne touchent que quelques acides aminés d'une séquence connue peuvent simplement être mentionnées sans qu'il soit nécessaire de donner la séquence au complet. Indiquer s'il a été constaté ou prédit que les modifications entraîneront des changements dans les modifications post-traductionnelles ou les sites essentiels à la structure ou à la fonction du produit génique.
- 1.2.3 Fournir une carte détaillée du vecteur (voir la figure 1) avec l'emplacement des séquences décrites ci-dessus, suffisante pour servir à l'analyse des données à l'appui de la caractérisation de l'ADN, y compris, au besoin, l'emplacement des sites de restriction et les régions utilisées comme sondes ou amorces pour la PCR.

## **2 HÉRÉDITÉ ET STABILITÉ DES CARACTÈRES INTRODITS QUI SONT FONCTIONNELS CHEZ LA PLANTE**

- 2.1 Pour les végétaux qui sont, soit à fertilité mâle, soit à fertilité femelle, ou aux deux, fournir des données qui démontrent le mode et la stabilité de l'hérédité et de l'expression des nouveaux caractères transgéniques. Si le nouveau caractère ne peut être directement mesuré par un biodosage, il peut se révéler nécessaire d'examiner directement l'hérédité de l'insert d'ADN, ainsi que l'expression de l'ARN.

2.2 Pour les végétaux qui sont, soit stériles, soit pour lesquels il est difficile de produire des semences (comme les pommes de terre androstériles multipliées végétativement), fournir des données pour démontrer que le caractère transgénique se maintient et s'exprime de façon stable au cours de la multiplication végétative pendant un certain nombre de cycles de production de la culture en question.

### 3 CARACTÉRISATION DE L'ADN INSÉRÉ DANS LA PLANTE

3.1 Pour toutes les régions codantes, fournir des données qui démontrent que des copies complètes ou partielles sont insérées dans le génome de la plante. Les régions codantes peuvent inclure des constructions à sens tronqué, des séquences modifiées génétiquement pour être non traduisibles, des constructions anti-sens, et des constructions contenant des ribozymes, peu importe si la région codante est censée ou devrait s'exprimer dans la plante transgénique. Les présentations canadiennes pourraient exiger l'indication du nombre de copies qui ont été insérées, y compris l'intégration de copies partielles ; et pour ce qui est des végétaux allopolyploïdes, de l'information pourrait être requise sur le génome parental qui a reçu l'insertion.

3.2 Pour les régions non codantes liées à l'expression de régions codantes :

3.2.1 Les données devraient démontrer si les promoteurs de végétaux sont insérés intacts avec les régions codantes dont ils ont pour but de réguler l'expression. Ces données se révéleront pertinentes lors de l'examen des points 4.1 et 4.2 ci-dessous.

3.2.2 L'analyse de l'ADN peut s'avérer nécessaire pour les introns, les séquences initiales, les terminateurs et les activateurs de cassettes qui s'expriment chez les végétaux. Les analyses d'ADN pourront être présentées sous la forme d'une analyse Southern, d'un séquençage d'ADN, d'analyses par PCR ou d'autres types d'information pertinente.

3.2.3 L'analyse de l'ADN peut s'avérer nécessaire pour les promoteurs et d'autres régions de régulation liées à des cassettes qui s'expriment chez les bactéries.

3.3 Pour ce qui est des régions non codantes qui n'ont aucune fonction végétale connue et ne sont pas liées à l'expression de régions codantes :

3.3.1 L'analyse de l'ADN peut être requise pour certaines séquences de fonction connue (p.ex. *ori V* et *ori-322*, *bom*, bordures de l'ADN-T d'*Agrobacterium* et éléments bactériens transposables).

3.3.2 L'analyse de l'ADN n'est pas requise pour toute séquence restante du squelette plasmidique lorsque le plasmide est bien caractérisé.

## 4 CARACTÉRISATION ET EXPRESSION DES PROTÉINES ET DE L'ARN

- 4.1 Pour toutes les régions codantes complètes insérées, fournir des données qui démontrent si la protéine est ou n'est pas produite comme prévu dans les tissus appropriés, conformément aux séquences de régulation associées qui commandent son expression (p. ex., si le gène est inductible, déterminer si le gène s'exprime dans les tissus appropriés aux conditions d'induction). Pour les végétaux résistants aux virus où les transgènes sont issus d'un génome viral, en plus de l'analyse de la protéine transgénique, déterminer la concentration d'ARN transgénique dans les tissus, selon les régions de régulation associées qui commandent l'expression du transgène. Les exceptions suivantes s'appliquent également :
- 4.1.1 Si la concentration de la protéine est inférieure aux limites de détection, les données sur l'ARN messager peuvent servir de remplacement.
- 4.1.2 L'analyse protéique des produits de gènes utilisés seulement comme marqueurs sélectionnables peut être omise dans certaines circonstances (p. ex., lorsqu'il existe au moins une copie complète d'un gène marqueur sélectionnable et que l'expression efficace du gène marqueur sélectionnable est vérifiée par le processus servant à sélectionner le tissu transformé).
- 4.1.3 Pour ce qui est des végétaux modifiés de façon à en exprimer l'ARN messager non traduisible, des constructions à sens tronqué, des constructions anti-sens ou des constructions contenant des ribozymes, étant donné que la fonction de ces constructions génétiques consiste précisément à modifier l'accumulation d'un ARN messager spécifique ou d'une protéine présents dans la plante transgénique, ne fournir des données que sur la concentration de la protéine cible (p. ex., la polygalacturonase de la tomate indigène serait la protéine cible de la polygalacturonase anti-sens nécessaire pour altérer le mûrissement de la tomate). Si la concentration de la protéine cible est inférieure au seuil de détection, déterminer la concentration de l'ARN messager cible.
- 4.2 Lorsqu'une analyse indique que l'insert ne contient qu'un fragment d'une région codante destinée à être exprimée dans une plante (plutôt qu'une région « complète »), déterminer si une protéine hybride ou une translecture peut être produite et dans quels tissus elle peut être située. Ce type de fragment peut être détecté par exemple par une analyse d'ADN ou d'ARN ou par des données d'expression comme le Western Blot.
- 4.3 La caractérisation de la protéine ou de l'ARN peut ne pas être nécessaire pour les fragments de construction génétique non censés être fonctionnels chez la plante (p. ex. fragments de gènes marqueurs sélectionnables et commandés par des promoteurs bactériens).