

ANNEXE I : DONNÉES DE CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE

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 à la pièce, ce qui permet d'examiner des séries de données supplémentaires ou moins nombreuses, selon le 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. 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	Une séquence d'ADN qui peut se traduire de façon à produire une protéine. Synonyme de cadre ouvert de lecture.
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 l'Institut national de la santé (INS). 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 Séquence 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 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'EBI. http://www.ebi.ac.uk/~flang/sp/sp.html
insert	Cette partie d'une construction (voir ci-dessus) qui est intégrée au génome de la plante receveuse.

région non codante

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 régions de fixation charpentière, des promoteurs, des séquences initiales, des activateurs, des introns, des terminateurs et toute autre séquence utilisée pour l'expression des gènes dans la plante ou d'autres hôtes, comme les origines de la réplication, les éléments transposables, les limites de l'ADN-T, les séquences *lox*, etc.

stabilité

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.

caractère(s)

Le(s) caractère(s) phénotypique(s) conféré(s) à la plante receveuse par l'insert transgénique.

vecteur

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 des 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 pathogénèse 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 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 et la taille de la séquence insérée

- 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 acido-aminée des gènes destinés à s'exprimer chez la plante, donner la citation. Si la séquence acido-aminée modifiée n'a pas été publiée, donner la séquence au complet en soulignant les modifications. Les modifications qui ne touchent que quelques acides aminés peuvent simplement être mentionnées sans donner la séquence au complet. Indiquer si les modifications sont réputées ou devraient entraîner 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 ou des amorces utilisées pour l'ACP et les régions utilisées comme sondes.

2 **HÉRÉDITÉ ET STABILITÉ DES CARACTÈRES INTRODUIIS 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 les génomes de la plante. Les régions codantes peuvent inclure des constructions à sens tronqué, des séquences manipulées 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.

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.

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*, limites 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.

4 CARACTÉRISATION DES PROTÉINES ET DE L'ARN ET EXPRESSION

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 le niveau d'ARN transgénique dans les tissus, conformément aux régions de régulation associées qui commandent l'expression du transgène. Les exceptions suivantes s'appliquent également :

- 4.1.1 Si la concentration protéique est inférieure aux limites de détection, les données sur l'ARN messenger peuvent servir de remplacement.
- 4.1.2 L'analyse protéique des produits de gènes utilisés seulement comme marqueurs sélectionnables peut être abandonnée 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 messenger non traduisible, des constructions à sens tronqué, des constructions anti-sens ou des constructions contenant des ribozymes, comme la fonction de ces constructions génétiques consiste précisément à modifier l'accumulation d'un ARN messenger spécifique ou d'une protéine présents dans la plante transgénique, fournir des données sur le niveau de la protéine cible seulement (p. ex., la polygalacturonase de la tomate indigène serait la protéine cible de la polygalacturonase anti-sens pour parvenir à altérer le mûrissement de la tomate). Si les concentrations de la protéine cible sont inférieures, aux seuils de détection, déterminer les concentrations de l'ARN messenger cible.
- 4.2 Lorsqu'un fragment d'une région codante qui doit s'exprimer dans une plante est décelé, déterminer si une protéine hybride peut être produite et dans quels tissus elle peut être située.
- 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).

Tableau 1 : Exemple d'un tableau qui décrit les éléments d'ADN d'un vecteur

Résumé d'éléments d'ADN chez PV-STBT02 (tiré du tableau III.1 de la demande de l'APHIS n° 94-257-01p)

Élément génétique	Taille ¹ , Kb	Fonction et source
RB	0,36	Un fragment de restriction du plasmide pTiT37 contenant les 24 pb de la limite droite de l'ADN-T du type nopaline, utilisé pour amorcer le transfert de l'ADN-T de la bactérie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> au génome de la plante (Depicker <i>et al.</i> , 1982)
E35S	0,62	Le promoteur du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) (Odell <i>et al.</i> , 1985) avec la région activante dupliquée (Kay <i>et al.</i> , 1987).
<i>cryIIIA</i>	1,8	Le gène qui confère la résistance au CPB. Le gène code une séquence acido-aminée identique à la protéine de régulation du CPB (désigné comme la protéine de la bande 3 du <i>B.t.t.</i>) trouvée dans le <i>B.t.t.</i> , comme le décrivent Perlak <i>et al.</i> (1993).
E9 3'	0,63	Une région non traduite A 3' d'une petite sous-unité de ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase du gène E9 (<i>rbcS</i>) du poids (Coruzzi <i>et al.</i> , 1984), qui a pour fonction de terminer la transcription et de diriger la polyadénylation de l'ARN messager <i>cryIIIA</i> .
NOS 3'	0,26	Une région non traduite A 3' du gène de la nopaline synthase qui a pour fonction de terminer la transcription et de diriger la polyadénylation de l'ARN messager <i>nptII</i> (Depicker <i>et al.</i> , 1982 ; Bevan <i>et al.</i> , 1983).
<i>nptII</i>	0,79	Le gène isolé de Tn5 (Beck <i>et al.</i> , 1982) qui code pour le type II de la néomycine phosphotransférase. L'expression de ce gène chez les cellules végétales confère de la résistance à la kanamycine et sert de marqueur sélectionnalbe pour la transformation (Fraleigh <i>et al.</i> , 1983).
35S	0,32	La région d'initiation 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) (Gardner <i>et al.</i> , 1981 ; Sanders <i>et al.</i> , 1987).
LB	0,45	Un fragment de restriction du plasmide Ti de l'octopine, pTi15955, contenant les 24 bp de la limite gauche de l'ADN-T, a servi à terminer le transfert de l'ADN-T de la bactérie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> au génome de la plante (Barker <i>et al.</i> , 1983).
<i>ori V</i>	1,3	Origine d'un segment de réplication pour ABI <i>Agrobacterium</i> issu du plasmide RK2 à hôtes diversifiés (Stalker <i>et al.</i> , 1981).
<i>ori-322/rop</i>	1,8	Un segment de pBR322 qui assure l'origine de la réplication pour le maintien du plasmide PV-STBT02 chez <i>E. coli</i> , la réplication de la région de l'amorce (<i>rop</i>) et du site <i>bom</i> pour le transfert conjugationnel dans les cellules de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Bolívar <i>et al.</i> , 1977 ; Sutcliffe, 1978).
<i>aad</i>	0,93	Un fragment isolé du transposon Tn7 contenant un gène de 0,79 kb qui code pour l'enzyme streptomycine adénylyltransférase permettant une sélection bactérienne sur la spectinomycine ou la streptomycine (Fling <i>et al.</i> , 1985).

1. Les tailles sont approximatives.

Figure 1 : Exemple d'une carte détaillée d'un vecteur plasmidique (tiré de la demande de n° 94-257-01p de l'APHIS).

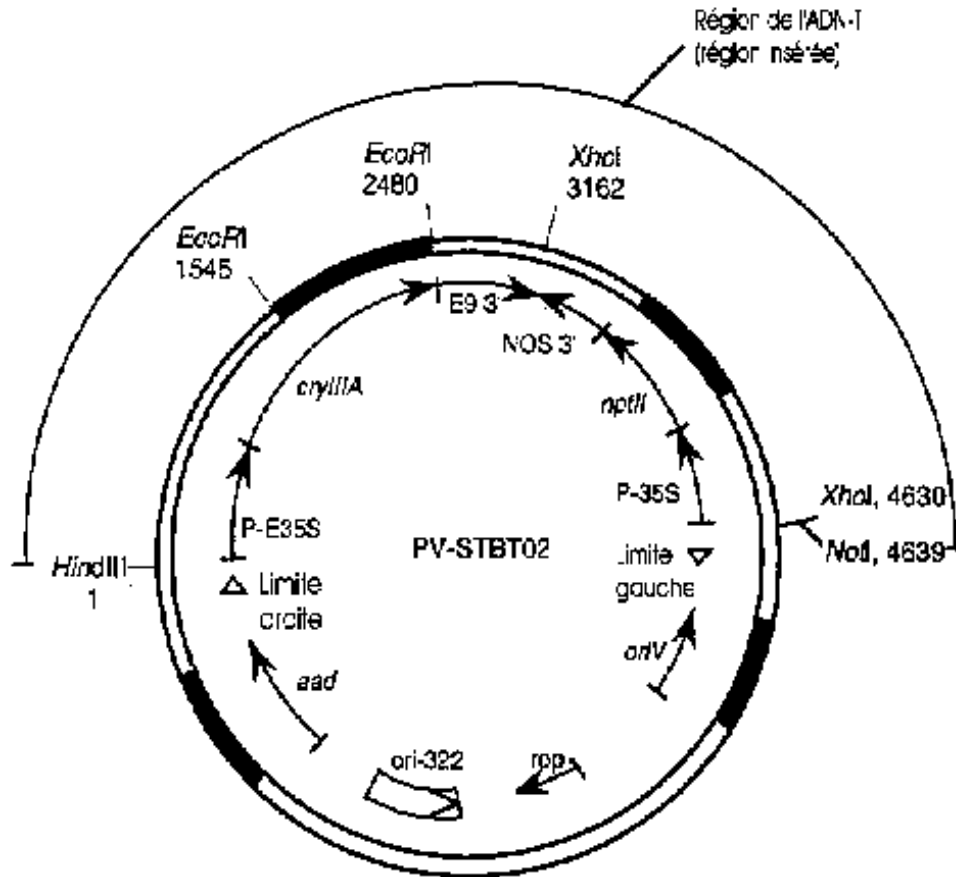


Figure III.1. Carte du plasmide PV-STBT02.

La figure montre les sites de restriction et leurs emplacements dans les paires de bases, utilisés au cours de transferts de Southern. La région qui a servi d'ADN-T est marquée et ses limites droite et gauche sont marquées par des triangles. Les régions noircies dénotent les positions d'homologie pour les sondes ACP utilisées au cours des transferts de Southern décrits dans la section V.A. La figure montre les sites de coupure pour les endonucléases de restriction *HindIII*, *EcoRI*, *xhoI* et *NotI*. Le tableau III.1 donne une description des éléments génétiques.