



Document de décisions

DD98-28

Détermination du risque associé à la lignée HCR-1 de canola (*Brassica rapa*) tolérante à l'herbicide Glufosinate-Ammonium, créée par la société AgrEvo Canada Inc.

Le présent document vise à expliquer les décisions réglementaires prises conformément à la directive Dir94-08, *Critères d'évaluation du risque environnemental associé aux végétaux à caractères nouveaux*, au cahier parallèle T-1-12-96, *La biologie du Brassica rapa L. (canola-navette)*, et à la directive Dir95-03, *Lignes directrices relatives à l'évaluation de végétaux à caractères nouveaux utilisés comme aliments du bétail*.

L'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA), plus précisément le Bureau de la biotechnologie végétale et la Section des aliments du bétail, de la Division des produits végétaux, avec la participation de l'Unité d'évaluation des risques phytosanitaires (ACIA), a évalué les données présentées par la société AgrEvo Canada Inc. relativement à la lignée HCR-1 de canola. Cette lignée a été obtenue par croisements interspécifiques avec des plants de *Brassica napus* modifiés par l'insertion de gènes leur conférant une tolérance au glufosinate-ammonium. L'ACIA a établi que la lignée de canola HCR-1 ne devrait pas présenter de risques pour l'environnement et qu'elle est sensiblement équivalente aux lignées déjà approuvées comme aliments du bétail.

La dissémination en milieu non isolé de la lignée hybride de *B. rapa* HCR-1 est par conséquent autorisée en Colombie-Britannique, en Alberta, en Saskatchewan et au Manitoba. Son utilisation comme aliment du bétail est également autorisée. De plus, toute lignée de *B. rapa* qui descendrait de cette lignée, qui serait issue de la même transformation ou qui aurait été transformée au moyen de la même construction génétique peut également être considérée comme essentiellement équivalente, pourvu qu'une caractérisation approfondie ait démontré qu'aucun autre croisement interspécifique n'a été réalisé, que l'utilisation prévue est la même et que le végétal ne présente aucun autre caractère nouveau.

Il convient de préciser également que, même si la détermination de l'innocuité des plantes à caractère nouveau comme aliments du bétail et du risque qu'elles présentent pour l'environnement constitue une étape déterminante de leur commercialisation, d'autres exigences doivent être satisfaites, dont l'homologation des variétés (ACIA).

(also available in English)

9 avril 1998

Document publié par la Division de la santé et la production animale et la Division de la santé et de la production des végétaux. Pour de plus amples renseignements, communiquer avec le Bureau de la biotechnologie végétale ou avec la Section des aliments du bétail, à l'adresse suivante :

Agence canadienne d'inspection des aliments
59, promenade Camelot
Nepean (Ontario) K1A 0Y9

Téléphone : (613) 225-2342
Télécopieur : (613) 228-6629

Table des matières

I. Brève identification du végétal à caractère nouveau (VCN)	1
II. Contexte	1
III. Description du caractère nouveau (tolérance au glufosinate-ammonium)	3
1. Tolérance au glufosinate -ammonium	3
2. Méthode de mise au point	4
3. Stabilité du caractère introduit dans le génome de la plante	4
IV. Critères d'évaluation du risque environnemental	5
1. Possibilité que le VCN se comporte comme une plante nuisible à l'agriculture ou envahisse les milieux naturels	5
2. Possibilité d'un flux génétique vers des espèces sauvages apparentées risquant de produire des hybrides se comportant comme des mauvaises herbes ou possédant une plus grande capacité d'envahissement	6
3. Possibilité que la lignée modifiée devienne nuisible	7
4. Impact possible sur les organismes non visés	7
5. Impact possible sur la biodiversité	7
V. Critères d'évaluation nutritionnelle en vue de l'utilisation comme aliment du bétail ..	8
1. Facteurs antinutritionnels	8
2. Composition nutritionnelle du VCN	8
VI. Décisions réglementaires	9

I. Brève identification du végétal à caractère nouveau (VCN)

Désignation:	HCR-1
Demandeur :	AgrEvo Canada Inc.
Espèce :	<i>Brassica rapa</i>
Nouveau caractère :	Tolérance à l'herbicide glufosinate-ammonium
Méthode d'introduction:	Croisement interspécifique avec une lignée transgénique de <i>B. napus</i>
Utilisation proposée :	Culture de <i>B. rapa</i> en vue de la production d'huile pour la consommation humaine ainsi que d'huile et de tourteau pour l'alimentation animale. La nouvelle lignée ne sera pas cultivée à l'extérieur de la zone de production normale de colza canola au Canada.

II. Contexte

La société AgrEvo Canada Inc. a obtenu la lignée hybride HCR-1 de *Brassica rapa* par croisement interspécifique avec la lignée transgénique T45 de *B. napus*. Cette nouvelle lignée exprime une tolérance au glufosinate-ammonium. Cette tolérance permettra l'utilisation du glufosinate-ammonium en post-levée sur les cultures de canola, ce qui procurera aux producteurs un autre moyen de lutte contre les mauvaises herbes et réduira leur dépendance à l'égard des herbicides à incorporer au sol. La lignée de *B. napus* transformée par l'introduction dans son génome du gène de tolérance au glufosinate-ammonium a été approuvée en mai 1996 (voir DD96-11.)

Un gène bactérien codant pour la phosphinothricine acétyltransférase, une enzyme qui inactive le glufosinate-ammonium par acétylation, a été introduit dans la lignée HCR-1 par un croisement interspécifique avec la lignée transformée T45 de *B. napus*. L'inactivation du glufosinate-ammonium par l'enzyme bactérienne confère à la nouvelle lignée la tolérance à l'herbicide.

La lignée de *B. rapa* tolérante au glufosinate-ammonium a fait l'objet d'essais en parcelles isolées au Canada (en Saskatchewan et en Alberta) en 1994, 1995 et 1996.

La société AgrEvo Canada Inc. a fourni des données sur l'identité de la lignée hybride HCR-1, la description de la méthode de modification employée, ainsi que de l'information sur le degré d'expression de la protéine nouvelle. Elle s'est aussi référée aux renseignements qu'elle avait soumis en demandant l'approbation de la dissémination dans l'environnement de la lignée HCN28 de *B. napus* (lignée issue de la lignée transformée T45) et de son utilisation pour l'alimentation du bétail.

Elle a aussi mentionné, le cas échéant, les publications scientifiques étayant l'information fournie. En outre, la société a communiqué des renseignements, des données et des observations consignées qui permettent de comparer la lignée HCR-1 à des lignées non transformées de colza canola polonais, quant à la précocité de floraison, à la précocité de maturation, au rendement grainier, à la hauteur des plantes, à la résistance à la verse, à la tolérance aux maladies, à la teneur en protéines, en huile et en fibres brutes, ainsi qu'au profil des acides gras.

Le Bureau de biotechnologie végétale de la Division de la santé et de la production des végétaux de l'ACIA a examiné les renseignements susmentionnés à la lumière des critères suivants, énoncés dans la directive de réglementation Dir94-08, *Critères d'évaluation du risque environnemental associé aux végétaux à caractères nouveaux* :

- possibilité que les VCN se comportent comme des mauvaises herbes pour l'agriculture ou envahissent les habitats naturels;
- possibilité de flux génétique vers des espèces sauvages apparentées risquant de produire des hybrides se comportant davantage comme des mauvaises herbes ou possédant une plus grande capacité d'envahissement;
- possibilité que les VCN deviennent nuisibles;
- impact possible des VCN ou de leurs produits géniques sur des espèces non visées, y compris l'être humain;
- impact possible sur la biodiversité.

La Section des aliments du bétail de la Division de la santé et de la production animale de l'ACIA a elle aussi étudié l'information susmentionnée, à la lumière des critères d'évaluation de l'innocuité et de l'efficacité des aliments du bétail, qui sont énoncés dans la directive de réglementation Dir95-03, *Lignes directrices relatives à l'évaluation de végétaux à caractères nouveaux utilisés comme aliments du bétail* :

- effets possibles sur le bétail;
- effets possibles sur la nutrition du bétail.

III. Description du caractère nouveau (tolérance au glufosinate-ammonium)

1. Tolérance au glufosinate-ammonium :

- La phosphinothricine (L-PPT), la matière active du glufosinate-ammonium, inhibe la glutamine-synthétase, ce qui produit une accumulation de quantités létales d'ammoniaque dans les plantes sensibles quelques heures après l'application.
- La tolérance à la phosphinothricine est conférée par le même gène que celui qui a été introduit dans la lignée HCN28 de canola (voir DD96-11). Ce gène code pour la PPT-acétyltransférase (PAT), une enzyme qui détoxifie la phosphinothricine en l'inactivant par acétylation. Cette enzyme présente une très haute spécificité vis-à-vis du substrat; des données expérimentales démontrent clairement qu'elle ne peut acétyler la forme L de l'acide glutamique (analogue de la L-PPT), ni la D-PPT, ni aucun acide aminé des protéines.
- Le gène codant pour la PAT a d'abord été isolé chez un actinomycète aérobie du sol, *Streptomyces viridochromogenes*. La PAT est donc présente à l'état naturel dans le sol. De manière générale, les acétyltransférases sont omniprésentes dans la nature.
- La teneur moyenne en PAT d'échantillons de semences prélevés dans trois parcelles d'essai s'établissait à 107 ng/g de tissu végétal. Les teneurs moyennes observées dans les trois parcelles variaient de 84 à 132 ng/g de tissu végétal. Les niveaux d'expression du gène codant pour la PAT sont comparables à ceux observés chez les lignées HCN92 and HCN28 de *B. napus* (95-250 ng/g), qui sont déjà approuvées.
- La séquence nucléotidique de la protéine PAT ne présentait aucune homologie appréciable avec des toxines ou des allergènes connus. En effet, contrairement à la plupart des allergènes, la protéine PAT ne possède pas de sites de glycosylation. L'ingestion de canola de la lignée HCR-1 par les animaux d'élevage ne présente aucun risque sanitaire pour ces derniers, puisque l'on n'a pas décelé d'activité de la PAT dans les tourteaux. L'enzyme brute est inactivée rapidement (en moins d'une minute) dans les sucs gastriques de chien (pH1,1). Même en milieu tamponné, l'inactivation est rapide (à pH 4,0 l'inactivation se produit en 10 minutes). Lorsque la protéine PAT est renfermée dans du tissu végétal, elle met 15 minutes à se dénaturer en présence de sucs gastriques de chien. La PAT n'a aucun effet nocif connu sur les insectes utiles ou pollinisateurs, et de nombreuses études corroborent son innocuité et sa spécificité.

2. Méthode de mise au point

- Le transformant T45 de *Brassica napus* a été obtenu en utilisant comme vecteur de transfert un fragment de plasmide désarmé non pathogène d'*Agrobacterium tumefaciens*; ce vecteur contenait le fragment ADN-T d'un plasmide d'*Agrobacterium tumefaciens*, dont les gènes responsables de la virulence et du pouvoir pathogène avaient été supprimés et remplacés par le gène codant pour la PAT. On sait que le fragment ADN-T d'*A. tumefaciens* s'insère au hasard dans le génome de la plante et que l'insertion est ordinairement stable. Une seule copie du gène codant pour la PAT a été introduite dans le transformant T45 de *B. napus* et aucune séquence située à l'extérieur des « bornes » de l'ADN-T n'a été décelée.
- Le transformant T45 a été utilisé comme source de pollen et le cultivar Parkland de *B.rapa* comme plante réceptrice. Une seule plantule a été sélectionnée. Puis on a réalisé trois rétrocroisements avec le cultivar Parkland, puis des croisements frère-sœur pour obtenir des plantes homozygotes destinées à la multiplication des semences.

3. Stabilité de l'intégration au génome de la plante

- Le gène transféré a été « séquencé » et sa fonction est bien caractérisée. La séquence des acides aminés de la protéine codant pour la PAT est connue. L'analyse par la méthode de Southern de produits de digestion par des enzymes de restriction, en utilisant comme sonde la bande 550 bp du gène PAT, a montré qu'une seule copie de l'ADN-T a été insérée dans le génome de *Brassica* (données fournis pour la lignée T-45), et que cette séquence est stable. Les résultats d'analyses de ségrégation portant sur la lignée hybride HCR-1 ont confirmé la stabilité de l'intégration de l'ADN- T dans le génome.
- Comme on a réussi à transférer la tolérance au glufosinate-ammonium du transformant T45 à la lignée HCR-1 *B. rapa* par hybridation et rétrocroisements, il semble que le gène codant pour ce caractère était situé dans la partie *B. rapa* du génome amphidiploïde *B. rapa/B. oleracea* de *B. napus*.

IV. Critères d'évaluation du risque environnemental

1. Possibilité que le VCN se comporte comme une mauvaise herbe pour l'agriculture ou envahisse les milieux naturels

L'ACIA a évalué les données et les renseignements fournis par la société AgrEvo Canada Inc. sur la biologie de reproduction et de survie de la lignée hybride HCR-1. À la lumière de ces données et renseignements, l'ACIA juge que la vigueur végétative, la précocité de floraison, la précocité de maturation et le rendement grainier de cette lignée se trouvent dans la gamme normale d'expression observée pour les lignées hybrides non modifiées de canola polonais. La lignée HCR-1 n'a pas reçu de gène supplémentaire visant à améliorer sa tolérance au froid ou sa capacité de survie hivernale. Elle n'a affiché aucune adaptation au stress autre que sa tolérance à l'herbicide, glufosinate-ammonium.

Selon la directive T-1-02-96, décrivant la biologie de *B. rapa*, cette espèce n'envahit pas habituellement les milieux naturels au Canada. Elle constitue parfois une mauvaise herbe des terres cultivées, particulièrement dans les provinces de l'Est. Selon l'information et les données fournies par la société AgrEvo, la lignée HCR-1 ne s'est pas révélée différente à cet égard des lignées homologues non modifiées de canola. L'ACIA convient qu'aucun avantage compétitif n'a été conféré à ce végétal par l'insertion du gène conférant la tolérance au glufosinate-ammonium, si ce n'est cette tolérance à l'herbicide. Le glufosinate-ammonium ne pourra éliminer les plants spontanés de canola résistants à cet herbicide. Ces plants pourront cependant être détruits par les agriculteurs au moyen d'herbicides présentant un mode d'action différent.

À la lumière de ces considérations et du fait qu'aucun caractère nouveau pouvant rendre la lignée HCR-1 nuisible ou envahissante n'a été intentionnellement introduit, l'ACIA conclut que cette lignée ne risque pas plus de se comporter davantage en mauvaise herbe ni de devenir plus envahissante que les variétés de canola actuellement commercialisées.

Remarque : À plus long terme, l'adoption généralisée de plusieurs cultures différentes et de systèmes spécifiques de lutte contre les mauvaises herbes pourrait aussi provoquer l'apparition de plants spontanés présentant des types nouveaux de tolérance à divers herbicides. En pareil cas, il se pourrait que l'on ne puisse plus utiliser ces herbicides ni retirer aucun de leurs avantages. Par conséquent, le personnel de vulgarisation agricole des secteurs public et privé doit encourager les producteurs qui utilisent ces cultures tolérantes à l'herbicide à adopter des méthodes de lutte prudentes permettant de réduire au minimum les risques de résistance multiple.

2. Possibilité de flux génétique vers des espèces sauvages apparentées risquant de produire des hybrides se comportant comme des mauvaises herbes ou possédant une plus grande capacité d'envahissement

Brassica rapa est une espèce à allofécondation obligatoire. Elle se croise habituellement avec d'autres sujets de la même espèce, et peut-être avec les espèces *B. napus*, *B. juncea*, *B. carinata*, *B. nigra*, *Diplotaxis muralis*, *Raphanus raphanistrum* et *Erucastrum gallicum* (voir T-1-12-96). Des études montrent que le risque d'introgession de la tolérance à l'herbicide concerne principalement *B. napus*, l'autre espèce d'importance de canola, qui n'est pas considérée comme une mauvaise herbe au Canada.

Si des sujets tolérants au glufosinate ammonium devaient naître à la suite d'une hybridation interspécifique ou intergénérique, cette tolérance ne conférerait à ces végétaux aucun avantage compétitif, sauf si on essayait de les supprimer à l'aide de l'herbicide. Cette situation ne pourrait survenir que dans les écosystèmes aménagés où le glufosinate ammonium est utilisé pour le désherbage non sélectif, et dans les champs de variétés créés pour tolérer le glufosinate ammonium et où cet herbicide est effectivement utilisé. Tout comme les plants spontanés de *B. rapa* tolérant le glufosinate ammonium, ces hybrides seraient faciles à détruire par d'autres méthodes chimiques disponibles. L'apparition éventuelle de ces hybrides pourrait menacer l'usage du glufosinate ammonium comme agent de lutte contre ces espèces. Cette situation peut être évitée en recourant à de saines pratiques de gestion des cultures.

Les considérations qui précèdent ont amené l'ACIA à conclure que le flux génétique de la lignée HCR-1 vers des espèces apparentées est possible, mais qu'il ne rendrait pas ces dernières plus envahissantes ni plus nuisibles aux cultures.

3. Possibilité que le VCN devienne nuisible

Les effets souhaités du caractère nouveau, la tolérance à un herbicide, n'ont aucun lien avec la possibilité que le VCN devienne nuisible, et *B. rapa* n'est pas considéré au Canada comme une espèce nuisible (voir T-1-12-96). De plus, AgrEvo a montré que les caractères agronomiques ainsi que la composition qualitative et quantitative de la lignée HCR-1 se situent à l'intérieur des limites observées chez les variétés non modifiées de canola. L'ACIA convient donc que la possibilité que le canola devienne nuisible n'a pas été modifié par inadvertance.

4. Impact possible sur les organismes non visés

La caractérisation détaillée du gène nouveau et de la nouvelle protéine, résumée brièvement dans la partie III du présent document, permet de conclure que *B. rapa* modifié ne devrait pas afficher de toxicité ni de propriétés allergènes modifiées. AgrEvo a donné des preuves que la PAT exprimée est rapidement inactivée par les sucs gastriques par dégradation enzymatique et protéolyse acide. L'enzyme PAT est fortement spécifique et affiche une cinétique caractéristique de celle que l'on retrouve dans le royaume végétal. Les profils des protéines et des acides gras se situent à l'intérieur des gammes de valeurs observées chez les homologues non modifiés.

À partir de ce qui précède, l'ACIA juge que la dissémination en milieu ouvert de l'hybride HCR-1 n'aurait pas plus d'effets que les variétés actuelles de canola sur les organismes avec lesquels il aurait des interactions, y compris l'être humain.

5. Impact possible sur la biodiversité

Il a été établi que les gènes introduits sont sans danger pour les organismes non visés. De plus, la lignée hybride HCR-1 ne présente aucun caractère phénotypique nouveau qui puisse en étendre l'usage au-delà de la zone actuelle de culture du canola au Canada. Comme les espèces pouvant s'hybrider avec *B. rapa* ne poussent que dans les milieux perturbés, le transfert vers ces espèces de la tolérance nouvelle à l'herbicide n'aurait aucun impact sur les milieux naturels.

L'ACIA estime donc que l'impact possible de la lignée hybride HCR-1 sur la biodiversité est équivalent à celui des variétés de canola actuellement commercialisées.

V. Critères d'évaluation nutritionnelle en vue de l'utilisation comme aliment du bétail

1. Facteurs antinutritionnels

Les teneurs en glucosinolate du VCN ont été déterminées dans des échantillons composites prélevés d'essais dans des zones de saison courte. Ces teneurs n'étaient pas significativement différentes de celles de la lignée témoin non modifiée. De plus, elles se situaient en deçà de la norme établie de 30 µM/g de tourteau sec. La concentration relative d'acide érucique dans le VCN et le témoin était semblable et bien en deçà de la limite de 2 % établie.

2. Composition nutritionnelle du VCN

Aucune différence statistique n'a été notée dans la composition nutritionnelle, en l'occurrence la teneur en protéines brutes, en lipides, en fibres, en cendres, les teneurs en énergie brute, la teneur en huile et la composition des acides gras n'ont été décelés entre le grain entier de la lignée HCR-1 et les cultivars actuels de canola commercial. Ces résultats montrent que l'introduction à *B. rapa* de la tolérance nouvelle à l'herbicide, qui a donné lieu à la lignée hybride HCR-1, n'aura probablement pas d'effets secondaires sur la composition ni la qualité nutritionnelle du cultivar. En conséquence, la lignée HCR-1 a été jugée sensiblement équivalente aux variétés courantes de canola quant à sa composition nutritionnelle.

VI. Décisions réglementaires

La présente décision tient compte de l'existence de populations de moutarde des oiseaux (type sauvage de *B. rapa*) au Québec, dans les provinces de l'Atlantique et, dans une moindre mesure, dans le sud de l'Ontario ainsi que du risque de transmission de la tolérance à l'herbicide glufosinate ammonium à ces populations de mauvaises herbes où cet herbicide est utilisé comme dés herbant. La décision a été arrêtée après consultation des obtenteurs, des malherbologistes et des agronomes d'universités et des services gouvernementaux provinciaux.

Après examen des données soumises, la Section des aliments du bétail de la Division des produits végétaux conclut que le gène nouveau s'exprimant dans la lignée hybride HCR-1 ne suscite aucune crainte quant à son innocuité dans l'alimentation du bétail ou sa composition nutritionnelle. Comme cette lignée s'est révélée, à l'évaluation, fondamentalement équivalente aux variétés conventionnelles de *B. rapa* quant son innocuité dans l'alimentation du bétail, la lignée HCR-1 et ses sous-produits sont approuvés comme ingrédients pouvant servir à l'alimentation du bétail au Canada.

Si jamais AgrEvo prenait connaissance de risques pour l'environnement ou la santé des êtres humains ou des animaux, risques qui découleraient de la dissémination de ces végétaux au Canada ou ailleurs, il doit immédiatement en informer l'ACIA. À la lumière de ces faits nouveaux, l'ACIA pourrait réévaluer l'incidence possible de la dissémination et revoir sa décision.

La dissémination en milieu ouvert de la lignée hybride de *B. rapa*, HCR-1, est donc autorisée en Colombie-Britannique, en Alberta, en Saskatchewan et au Manitoba. L'utilisation de cette lignée comme aliment du bétail est également autorisée. De plus, toute lignée de *B. rapa* qui descendrait de HCR-1, qui serait issue de la même transformation ou qui aurait été transformée au moyen de la même construction génétique peut également être considérée comme essentiellement équivalente, pourvu qu'une caractérisation approfondie ait démontré qu'aucun autre croisement

interspécifique n'a été réalisé, que l'utilisation prévue est la même et que le végétal ne présente aucun autre caractère nouveau.

Cependant, même si la détermination du risque environnemental et de l'innocuité dans l'alimentation du bétail associée à des végétaux à caractère nouveau constitue une étape déterminante de leur commercialisation, d'autres exigences doivent encore être satisfaites, dont l'enregistrement de la variété, qui relève de l'ACIA.