



Document de décision

DD1999-33

Détermination de la sécurité de la lignée GA21 de maïs (*Zea mays* L.) tolérant l'herbicide Roundup Ready^{MC} créée par Monsanto 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*, à la directive d'accompagnement Dir94-11, *La biologie de Zea mays L. (maïs)*, 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 biotechnologie végétale (BBV) de la Division de la production et de la protection des végétaux et la Section des aliments du bétail de la Division de la santé des animaux et de l'élevage, avec la participation du Module d'évaluation des risques phytosanitaires, a évalué les données présentées par Monsanto Canada Inc. Cette information concerne la lignée de maïs GA21 tolérant le glyphosate. L'ACIA a établi que ce végétal doté d'un caractère nouveau (VCN) ne présentait pas d'interactions environnementales modifiées ni ne fait craindre pour la sécurité du bétail consommant des aliments qui en sont dérivés, par rapport aux variétés de maïs déjà commercialisées au Canada.

La dissémination en milieu ouvert de la lignée de maïs GA21 et son utilisation comme aliment du bétail sont donc autorisées en date du 23 avril 1998. Les autres lignées de *Zea mays* et les hybrides intraspécifiques résultant de la même transformation ainsi que tous leurs descendants peuvent aussi être disséminés dans l'environnement et utilisés comme aliment du bétail pourvu qu'aucun croisement interspécifique ne soit réalisé, que l'usage prévu soit le même et qu'une caractérisation approfondie ait démontré que ces plantes n'affichent aucun autre caractère nouveau et sont essentiellement équivalentes au maïs actuellement cultivé, pour ce qui est de son incidence potentielle sur l'environnement et de sa sécurité comme aliment du bétail.

La lignée de maïs GA21 est assujettie aux mêmes conditions d'importation phytosanitaires que ses contreparties non modifiées.

Prière de noter cependant que, même si la détermination du risque environnemental posé par les végétaux à caractère nouveau et de leur sécurité comme aliments du bétail constitue une étape critique dans la commercialisation de ces types de plantes, d'autres exigences doivent encore être satisfaites, dont l'évaluation de l'innocuité alimentaire (Santé Canada).

(Also available in English)

Le 30 mars 1999

Document publié par la Division de la production et de la protection des végétaux. Pour de plus amples renseignements, communiquer avec le Bureau de biotechnologie végétale ou avec la Section des aliments du bétail, aux adresses suivantes :

Bureau de biotechnologie végétale
Division de la production et de la protection des végétaux
Direction des produits végétaux
59, promenade Camelot
Nepean (Ontario) K1A 0Y9
Tél. : (613) 225-2342

Section des aliments du bétail
Division de la santé des animaux et de l'élevage
Direction des produits animaux
59, promenade Camelot
Nepean (Ontario) K1A 0Y9
Tél. : (613) 225-2342

Table des matières

I. Brève identification du végétal à caractère nouveau (VCN)	1
II. Contexte	1
III. Description du caractère nouveau	2
1. Tolérance au glyphosate	2
2. Méthode de modification	4
3. Stabilité de l'intégration au génome de la plante	4
IV. Critères d'évaluation du risque environnemental	4
1. Possibilité que le VCN se comporte comme une mauvaise herbe pour l'agriculture ou envahisse les milieux naturels	4
2. Possibilités 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	5
3. Possibilité que le VCN devienne nuisible	5
4. Impact possible sur les organismes non visés	5
5. Impact possible sur la biodiversité	6
V. Critères d'évaluation nutritionnelle en vue de l'utilisation comme aliment du bétail	6
1. Composition nutritionnelle du VCN	6
2. Facteurs antinutritionnels	7
VI. Décisions réglementaires	7

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

Désignation :	GA21
Demandeur :	Monsanto Canada Inc.
Espèce :	<i>Zea mays</i> L.
Caractère nouveau :	Tolérance à un herbicide (glyphosate)
Méthode d'introduction :	Bombardement des cellules végétales avec des microprojectiles
Utilisation proposée :	Culture en vue de la production d'huile pour la consommation humaine ainsi que d'huile, de tourteau et d'ensilage pour l'alimentation animale. La lignée ne sera pas cultivée en dehors de la zone de production normale du maïs au Canada.

II. Contexte

Monsanto Canada Inc. a mis au point une lignée de maïs à partir des lignées de maïs autofécondées AT, qui renferme un gène mEPSPS, codant pour la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase (EPSPS). Ce gène confère une tolérance au glyphosate, matière active de l'herbicide Roundup®, tolérance qui permet de contrer ou de supprimer des mauvaises herbes du maïs préoccupantes sur le plan économique.

La mise au point d'une lignée de maïs tolérant le glyphosate a été réalisée à l'aide de la technologie de l'ADN recombinant. Un gène mEPSPS issu du maïs a été inséré dans une lignée en culture cellulaire, et les transformants ont été sélectionnés en fonction de leur capacité à supporter le glyphosate. Le gène de maïs modifié confère une sensibilité réduite au Roundup au site d'activité de l'herbicide. L'expression du gène est dirigée vers les chloroplastes, site où intervient l'herbicide, grâce à l'addition de séquences de nucléotides codant pour un peptide de transfert d'origine végétale.

Monsanto Canada Inc. a fourni : des données sur l'identité de la lignée GA21, une description détaillée de la méthode de transformation, des données et de l'information sur le site d'insertion du gène, le nombre de copies et les niveaux d'expression dans la plante, le rôle du gène inséré et les séquences régulatrices dans les organismes donneurs ainsi que la séquence complète des nucléotides. La protéine nouvelle a été identifiée, caractérisée et comparée à la protéine végétale originale, démarche comprenant entre autres une évaluation de sa toxicité potentielle pour le bétail et les organismes non visés. Des références aux publications scientifiques pertinentes ont été incluses.

En 1997, ces lignées ont fait l'objet d'essais au champ pratiqués en milieu confiné en Ontario. Des essais sur le terrain ont aussi été réalisés aux États-Unis.

Enfin, des caractères agronomiques des maïs hybrides issus de GA21, comme la dormance de la semence, la vigueur végétative (hauteur de la plante), la vigueur de la plante, le délai de maturation, la période de floraison, la sensibilité à divers parasites et pathogènes de *Z. mays* ainsi que le rendement grainier, ont été comparés à ceux de contreparties non modifiées de *Z. mays*.

Le Bureau de biotechnologie végétale (BBV) de la Division de production et de la protection des végétaux de l'ACIA a examiné les renseignements susmentionnés à la lumière des critères servant à déterminer le risque environnemental que comportent les plantes dotées de caractères nouveaux, conformément à la directive de réglementation Dir94-08, soit :

- 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 des animaux et de l'élevage de l'ACIA a, elle aussi, étudié l'information susmentionnée, mais à la lumière des critères servant à évaluer l'innocuité et l'efficacité de VCN comme aliments du bétail, lesquels critères sont énoncés dans la directive de réglementation Dir95-03, soit :

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

III. Description du caractère nouveau

1. Tolérance au glyphosate

- Un gène de maïs modifié de type sauvage, qui confère au maïs dans le champ une résistance au glyphosate, matière active de l'herbicide Roundup, a été introduit dans la lignée de maïs GA21.
- Une séquence génétique d'origine végétale codant pour un peptide de transfert chloroplastique optimisé a été fusionnée au gène de maïs modifié. Ce peptide facilite l'importation dans le chloroplaste, site à la fois de la voie shikimique de biosynthèse et de l'activité du glyphosate, de l'enzyme EPSPS de maïs modifiée résultant de l'expression du gène.

- Le gène inséré code pour une version de l'enzyme native 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase (EPSPS), qui joue un rôle dans la voie shikimique de biosynthèse des acides aminés aromatiques. On sait que la version de type sauvage de cette enzyme du maïs est sensible au glyphosate. L'herbicide en question, en perturbant cette voie essentielle, entraîne un arrêt de croissance de la plante ou sa mort. Une version modifiée de l'enzyme végétale a été créée par mutagenèse dirigée contre le site. Or l'enzyme modifiée, en tolérant le glyphosate, permet à la plante de synthétiser les acides aminés aromatiques en présence de l'herbicide. L'expression de la nouvelle enzyme dans la plante a été quantifiée.
- La nouvelle enzyme exprimée est un polypeptide simple dont l'identité de la séquence par rapport au type sauvage est de 99,3 p. 100.
- L'EPSPS du maïs modifiée (EPSPSm) a été décelée par la méthode de transfert Western. Les données produites par cette méthode ont montré que l'expression de l'EPSPS dans les plantes transformées était supérieure d'un ordre de grandeur à celle observée chez les plantes non transformées. Un gène codant pour l'EPSPSm a été exprimé dans des bactéries, et l'enzyme résultante a été comparée à l'EPSPSm d'origine végétale par la méthode de transfert Western. Les enzymes exprimées provenant de ces deux sources se sont révélées identiques. L'enzyme microbienne a servi à l'évaluation de la cinétique enzymatique et à la réalisation d'études toxicologiques ainsi que comme témoin dans la détermination de l'expression de la protéine chez la plante modifiée.
- On a évalué l'expression du gène EPSPSm dans les fourrages et les grains produits par des plantes cultivées au champ à cinq endroits. Pour ce faire, des échantillons de grains combinés, prélevés de 9 à 16 épis, ont été analysés. L'expression de la protéine EPSPS s'est établie en moyenne à 3,2 µg/g de poids frais (marge allant de 1,4 à 4,9 µg/g de poids frais). L'expression de l'EPSPS de type sauvage dans le grain a été impossible à déceler aux cinq endroits. Quant à l'expression de l'EPSPS dans les fourrages (toute la plante moins les racines), elle s'est située en moyenne à 118,7 µg/g de poids frais (marge allant de 46,6 à 210,4 µg/g poids frais). L'EPSPS de type sauvage a été décelée à quatre des cinq endroits, mais pas en quantité insuffisante pour être quantifiée.
- La protéine EPSPSm n'a pas résisté à la digestion. En effet, elle a été complètement digérée en l'espace de 15 secondes dans un suc gastrique simulé (pepsine) et en moins d'une minute dans un suc intestinal simulé (pancréatine). Les résultats ont été révélés par la méthode de transfert Western.
- Aucune toxicité imputable à la protéine n'est ressortie des études sur les animaux. Une base de données des séquences de toxines protéiniques a été assemblée à partir de bases de données publiques et comparée à la séquence d'acides aminés de l'EPSPSm. Même en s'aidant du programme d'ordinateur FASTA, on n'est pas parvenu à déceler des similitudes entre les séquences biologiquement pertinentes de

l'EPSPSm et des toxines connues. Une base de données comprenant 219 séquences d'allergènes et de gliadines a été construite à partir de bases de données du domaine public, mais on n'a découvert aucune similarité significative entre les séquences de l'EPSPSm et celles des gliadines et allergènes connus. Des données ont été présentées qui montraient que la protéine n'a pas été glycosylée, propriété commune à de nombreux allergènes. Enfin, l'EPSPS étant une enzyme qui se trouve partout dans la nature, on ne s'attend pas normalement à ce qu'elle soit toxique ni allergène.

2. Méthode de modification

La lignée de maïs GA21 a été transformée à l'aide d'un fragment d'ADN ne contenant que le gène de l'EPSPS de maïs modifiée fusionné respectivement à un peptide de transfert chloroplastique optimisé et à des promoteurs. Le fragment d'ADN a été introduit par bombardement avec des microprojectiles de cellules végétales en culture, après quoi on a sélectionné des cellules transformées tolérantes au glyphosate, puis on les a transférées dans un milieu de culture de tissus pour régénérer la plante.

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

L'analyse par transfert Southern de la lignée de maïs transformé révèle la présence d'une seule séquence insérée, renfermant trois copies internes du gène de l'EPSPSm.

Des données obtenues par l'analyse de transfert Southern pratiquée sur deux générations de la lignée GA21 ont été présentées. Après quatre générations de sélection, les résultats de cette analyse montraient toujours des spectres de bandes identiques. La lignée a continué d'afficher une tolérance au glyphosate durant la sélection.

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

D'après la directive Dir94-11, décrivant la biologie du maïs (*Zea mays*), les plantes non modifiées de cette espèce n'envahissent pas les milieux naturels au Canada. Le maïs est incapable de devenir une mauvaise herbe à cause de certains caractères comme l'absence de dormance des graines, le fait que les épis ne s'égrènent pas et la piètre compétitivité des jeunes plants. Selon l'information fournie par Monsanto Canada Inc., la lignée GA21 et les hybrides de maïs ne se sont pas révélés différents à cet égard de leurs contreparties non modifiées.

L'ACIA a évalué les données fournies par Monsanto Canada Inc. sur la biologie de reproduction et de survie des maïs hybrides issus de la lignée GA21. À partir de ces données, l'ACIA estime que la précocité d'installation, la vigueur végétative, le délai de maturation et le rendement grainier se situent à l'intérieur des limites normalement

observées chez les hybrides de maïs commerciaux. La lignée n'a pas reçu de gènes supplémentaires visant à améliorer sa résistance au froid ou sa capacité de survie hivernale.

Aucun avantage compétitif n'a été conféré à ces plantes, sinon celui que donne la résistance à l'herbicide appelé glyphosate. Mais la résistance au Roundup n'aura pas, en soi, l'effet de donner au maïs un comportement de mauvaise herbe ou de lui permettre d'envahir les habitats naturels puisque aucun de ses caractères de reproduction ni de croissance n'a été modifié.

À la lumière de ces considérations et du fait qu'aucun caractère nouveau pouvant rendre la lignée nuisible ou envahissante n'a été intentionnellement introduit, l'ACIA conclut que la lignée de maïs GA21 ne risque pas plus de se comporter en mauvaise herbe ni de devenir envahissante que le maïs actuellement commercialisé.

À plus long terme, cependant, l'adoption généralisée éventuellement de plusieurs systèmes de lutte contre les mauvaises herbes fondés sur des herbicides spécifiques pour différentes cultures pourrait provoquer l'apparition de plantes spontanées présentant une combinaison de résistances nouvelles à divers herbicides. En pareil cas, il se pourrait que l'on ne puisse plus utiliser ces derniers 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 tolérant l'herbicide à adopter des méthodes de lutte prudentes permettant de réduire au maximum les risques de résistance multiple.

2. Possibilités 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

La biologie du maïs, décrite dans la directive Dir94-11, montre qu'il n'existe pas au Canada de plantes sauvages apparentées à *Zea mays* qui peuvent s'hybrider avec lui.

Par conséquent, l'ACIA conclut à l'impossibilité au Canada d'un flux génétique depuis la lignée de maïs GA21 à des plantes apparentées.

3. Possibilité que le VCN devienne nuisible

Les effets souhaités du caractère nouveau n'ont aucun lien avec la possibilité que le VCN devienne un végétal nuisible, le maïs n'étant pas un végétal nuisible au Canada (Dir94-11). En outre, les caractères agronomiques des hybrides de maïs modifiés ne dépassent pas les limites observées chez les hybrides de maïs commercialisés actuellement et montrent que le développement du maïs n'a pas été accidentellement modifié. Par contre, on sait que le glyphosate est communément utilisé pour la production de jachère chimique, et des plantes spontanées de maïs résistant ne seront pas éliminées. Malgré cette tolérance au glyphosate, les plantes spontanées GA21 pourront quand même être éliminées par les producteurs à l'aide d'autres herbicides

ayant des modes d'action différents. Enfin, des observations sur le terrain n'ont pas montré de modifications au chapitre des sensibilités aux maladies et aux parasites.

L'ACIA a donc conclu que la lignée de maïs GA21 ne présentait pas de risques de devenir nuisible.

4. Impact possible sur les organismes non visés

La caractérisation détaillée du gène nouveau et de l'enzyme correspondante, résumée dans la partie III du présent document, permet de conclure que l'expression de la nouvelle protéine n'entraîne aucune modification de la toxicité ou du pouvoir allergène. L'enzyme devient rapidement inactive en présence des sucs gastriques et intestinaux de mammifères, par dégradation enzymatique ou protéolyse acide. Les profils de protéines et d'acides gras des graines se situent à l'intérieur des gammes de valeurs observées chez les contreparties non modifiées. Une recherche dans la base de données FAST sur les séquences d'acides aminés n'a permis de relever aucune homologie appréciable des protéines nouvelles avec les toxines et allergènes répertoriés dans cette base de données.

À partir de ces considérations, l'ACIA estime que la lignée de maïs GA21, si elle était disséminée en milieu ouvert, n'aurait pas plus d'impact que les variétés actuelles de maïs sur les organismes avec lesquels elle aurait des interactions, y compris l'être humain.

5. Impact possible sur la biodiversité

La lignée GA21 ne présente aucun caractère phénotypique nouveau qui puisse en étendre l'usage au-delà de la zone actuelle de culture du maïs au Canada. Comme le maïs ne se croise pas à des plantes sauvages apparentées au Canada, il n'y a pas de risque de transfert du nouveau caractère à des milieux naturels. De plus, le caractère nouveau a été jugé sans danger pour les organismes non visés.

L'ACIA conclut donc que l'impact possible de la lignée GA21 sur la biodiversité ne sera pas modifié.

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

1. Composition nutritionnelle du VCN

Au cours de trois essais séparés, on a comparé les teneurs en protéines, lipides, fibres, cendres, Ca, P, acides aminés et acides gras du grain, et les teneurs en protéines, lipides, fibres, cendres, Ca et P de toute la matière végétale de la lignée du VCN avec celles de sa lignée parentale ainsi que de cinq ou six variétés commerciales non modifiées. Tant pour le grain que pour la plante entière, on a constaté des différences

parfois significatives dans les essais individuels comparant le VCN aux non-VCN pour ce qui est de la teneur en protéines du grain, mais on n'a observé généralement aucune différence entre les variétés pour la teneur en n'importe quel des nutriments. Il n'y avait pas de différences dans les autres nutriments, que ce soit dans le grain ou le fourrage.

Dans le VCN, la composition nutritionnelle se situait à l'intérieur des limites de résultats publiés pour le maïs, que ce soit pour le grain ou la plante entière. L'ACIA en a conclu que la lignée GA21 était substantiellement équivalente aux variétés de maïs classiques.

2. Facteurs antinutritionnels

La plante parentale *Zea mays* n'est pas connue pour la production de facteurs antinutritionnels, et l'on ne s'attend pas à ce que la série de transformations qui ont abouti à la production de GA21 en induise la synthèse.

VI. Décisions réglementaires

Après examen des données et des renseignements présentés par Monsanto Canada Inc., et par comparaison des hybrides de maïs issus de la lignée GA21 avec leurs contreparties non modifiées, le Bureau de biotechnologie végétale de la Division de la production et de la protection des végétaux de l'ACIA conclut que le gène nouveau et les caractères correspondants ne confèrent pas à ces plantes de propriétés qui entraîneraient des effets intentionnels ou accidentels sur l'environnement après leur dissémination dans un milieu non confiné.

Après examen des données et des renseignements soumis, la Section des aliments du bétail de la Division de la santé des animaux et de l'élevage conclut que le caractère nouveau ne soulève pas en soi de préoccupations en ce qui concerne l'innocuité ou la composition nutritionnelle de la lignée GA21. Le maïs-grain, ses sous-produits et l'huile de maïs figurent actuellement dans l'annexe IV du *Règlement sur les aliments du bétail*, de sorte que leur usage est approuvé dans l'alimentation du bétail au Canada. La lignée GA21 et les hybrides de maïs qui en sont issus se sont avérés, après évaluation, essentiellement équivalents aux variétés classiques de maïs. On juge que la lignée GA21 et ses sous-produits satisfont aux définitions actuelles d'ingrédients, et leur usage est approuvé comme ingrédients dans l'alimentation du bétail au Canada.

La dissémination en milieu ouvert de la lignée de maïs GA21 et son utilisation comme aliment du bétail sont donc autorisées en date du 23 avril 1998. Les autres lignées de *Zea mays* et les hybrides intraspécifiques résultant de la même transformation ainsi que tous leurs descendants peuvent aussi être disséminés dans l'environnement et utilisés comme aliment du bétail pourvu qu'aucun croisement interspécifique ne soit réalisé, que l'usage prévu soit le même et qu'une caractérisation approfondie ait démontré que ces plantes n'affichent aucun autre

caractère nouveau et sont essentiellement équivalentes au maïs actuellement cultivé, pour ce qui est de son incidence potentielle sur l'environnement et de sa sécurité comme aliment du bétail.

La lignée de maïs GA21 est assujettie aux mêmes conditions d'importation phytosanitaires que ses contreparties non modifiées.

Prière de noter cependant que, même si la détermination du risque environnemental posé par les végétaux à caractère nouveau et de leur sécurité comme aliments du bétail constitue une étape critique dans la commercialisation de ces types de plantes, d'autres exigences doivent encore être satisfaites, dont l'évaluation de l'innocuité alimentaire (Santé Canada).