



## VÉGÉTAUX À CARACTÈRES NOUVEAUX

### EXEMPLE DE PRÉSENTATION : FICHE TECHNIQUE

Description du processus et du cadre réglementaires ainsi que des exigences d'information, et exemple de données généralement présentées à l'appui des évaluations du risque environnemental et du risque pour la sécurité de l'alimentation du bétail associés aux végétaux à caractères nouveaux.

*L'information fournie a été résumée et seule une partie des données est fournie. La présentation ne doit pas être considérée comme une présentation exhaustive, mais seulement comme un exemple visant à améliorer la compréhension du processus de réglementation des végétaux à caractères nouveaux.*

## TABLE DES MATIÈRES : Végétaux à caractères nouveaux

1.0)	Introduction	2
i)	<i>Portée et contexte</i>	2
ii)	<i>Principes et cadre de réglementation</i>	4
iii)	<i>Végétaux à caractères nouveaux (VCN)</i>	7
iv)	<i>Exigences en matière de données pour l'approbation de la dissémination dans l'environnement et de l'utilisation pour l'alimentation du bétail</i>	9
	<i>Biologie de l'espèce végétale</i>	9
	<i>Modification génétique</i>	10
	<i>Environnement</i>	12
	<i>Alimentation du bétail</i>	13
	<i>Techniques</i>	13
2.0)	La fiche technique	14
3.0)	Détails de la fiche technique	14
i)	<i>Description et évaluation du caractère nouveau</i>	14
	<i>Exemple de données</i>	16
ii)	<i>Caractérisation de la modification génétique</i>	17
	<i>Exemple de données</i>	18
iii)	<i>Critères d'évaluation environnementale</i>	19
	<i>Exemple de données</i>	20
iv)	<i>Critères d'évaluation des risques pour l'alimentation du bétail</i>	21
	<i>Exemple de données</i>	23
4.0)	Nouvelles exigences en matière d'information	25
5.0)	Décisions réglementaires	26
	Annexe A : Cultures vivrières	27
	Annexe B : Familiarisation avec les caractères nouveaux	29
	Annexe C : Constructions génétiques	31
	Annexe D : Expression	35
	Annexe E : Processus de transformation	37
	Annexe F : Caractérisation moléculaire	38
	Annexe G : Intégrité des caractères	47
	Annexe H : Données agronomiques	54
	Annexe I : Interactions avec l'environnement	54
	Annexe J : Spécificité des caractères	58
	Annexe K : Culture	62
	Annexe L : Toxicité et allergénicité	63
	Annexe M : Étude d'alimentation animale	66
	Annexe N : Données compositionnelles	67

## 1.0) Introduction

### *j) Portée et contexte*

L'industrie et les producteurs affirment que les produits agricoles issus de la biotechnologie offrent des avantages potentiels, parmi lesquels l'aide à la lutte contre les ravageurs, l'atténuation des pertes de récoltes et l'amélioration des aliments pour les humains et les animaux. Parallèlement, l'application de toute nouvelle technologie à l'agriculture, ce qui inclut la biotechnologie, soulève des questions, parmi lesquelles les effets potentiels sur les humains, le bétail ou l'environnement.

Pour répondre à ces questions, les responsables gouvernementaux de la réglementation évaluent soigneusement les produits à caractères nouveaux issus de la biotechnologie. Les évaluations du risque pour la sécurité réalisées par l'ACIA visent à obtenir le maximum d'information possible sur le produit à caractères nouveaux en utilisant une approche comparative décrite pour la première fois dans un document publié par l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) en 1993. Ce document représentait le résultat des discussions menées par 60 experts de 19 pays au cours de deux années de travail sur la façon d'évaluer les risques posés par les plantes et les aliments génétiquement modifiés. L'approche comparative retenue a été, de plus, acceptée par l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) lors de consultations auprès de spécialistes des deux organismes en 1996 et à nouveau en 2000. Les experts mondiaux ont déterminé que ce processus sert à protéger la santé des humains, des animaux et de l'environnement.

Un VCN est un végétal qui possède un caractère qui n'est pas présent chez les végétaux de même espèce dont il existe déjà au Canada des populations stables et en culture, ou qui est exprimé en dehors de la gamme des caractéristiques similaires existant chez des populations stables et en culture de cette même espèce végétale au Canada. Tous les VCN sont assujettis à une évaluation du risque environnemental.

Avant que l'introduction d'un VCN dans l'environnement ne soit autorisée et qu'il puisse être utilisé pour l'alimentation de bétail ou des humains, on évalue le risque pour la sécurité que soulève ce VCN à partir des données réunies au moyen d'analyses approfondies. Les données présentées doivent être de la même qualité supérieure que celles qui sont soumises aux revues scientifiques approuvées par des collègues. Pour chaque nouveau produit, les responsables de la réglementation doivent déterminer les éléments suivants :

1. l'effet potentiel du produit sur la santé des humains;
2. l'effet potentiel du produit sur le bétail et sa nutrition;
3. l'incidence environnementale potentielle du produit.

Plus d'un ministère et d'une agence du gouvernement participent à la réglementation globale des VCN. Les principaux responsables de réglementation sont l'Agence

canadienne d'inspection des aliments (ACIA) et Santé Canada. Le Bureau de la biosécurité végétale de l'ACIA est chargé de réglementer l'introduction dans l'environnement au Canada de plantes cultivées agricoles et horticoles présentant des caractères nouveaux. La Section des aliments du bétail de l'ACIA est chargée de réglementer l'utilisation des VCN pour l'alimentation du bétail. Santé Canada est responsable de la réglementation des aliments fabriqués à partir de VCN.

Le présent document fournit un aperçu des principes et de la portée du processus utilisé pour rendre des décisions réglementaires concernant des végétaux à caractères nouveaux. Elle présente également des exemples du type de données requises et produites par le demandeur.

Le présent document renferme de l'information tirée d'une présentation d'un promoteur. L'ensemble du dossier présenté va de plusieurs centaines à plusieurs milliers de pages, selon la combinaison végétal-caractère et les études requises. Lorsque l'on constate des lacunes ou désire des précisions, comme cela s'est produit dans ce cas, les examinateurs demanderont des éclaircissements qui amèneront généralement le promoteur à fournir des données supplémentaires.

Les exemples d'information et de données fournis dans ce sommaire sont basés sur les données présentées par les demandeurs. Une partie des données et des techniques employées pour produire ces données pourrait être remplacée par des techniques et méthodes nouvelles. Toutefois, une grande partie de l'interprétation demeurera similaire. Les données et l'information sommaires sont fournies à des fins d'illustration et ne se veulent pas un jugement formel sur la méthodologie de collecte ou d'interprétation des données. Il convient de noter que certaines informations ont été résumées et que les données ne constituent qu'un sous-ensemble des données soumises à l'origine.

L'ACIA aimerait remercier Monsanto Canada Inc. qui a mis les données à sa disposition pour la préparation de ce document.

Le présent document décrit un VCN qui a été évalué pour fin de dissémination en milieu non confiné et d'alimentation du bétail.

Il convient de souligner que dans les faits, un VCN susceptible d'être introduit dans la chaîne alimentaire sera évalué du point de vue du risque pour la salubrité des aliments. Veuillez noter que Santé Canada est responsable de l'évaluation du risque pour la salubrité des aliments.

## ii) **Principes et cadre de réglementation**

En 1993, le gouvernement fédéral a annoncé un cadre de réglementation des produits issus de la biotechnologie au Canada, appelé *Cadre fédéral de réglementation de biotechnologie*. L'un de ses principes veut qu'on ait recours aux organismes actuellement chargés de la législation et de la réglementation pour réglementer les produits issus de la biotechnologie. Cela signifie que les produits agricoles issus de la biotechnologie sont réglementés en utilisant les mêmes pouvoirs que ceux qui s'appliquent aux produits agricoles obtenus de méthodes plus traditionnelles, mais en utilisant des procédures administratives différentes. On trouvera des précisions sur les lois et règlements agricoles que l'ACIA administre et fait respecter à l'adresse :

- <http://www.inspection.gc.ca/francais/reg/regf.shtml>

L'ACIA est responsable de la réglementation des produits agricoles issus de la biotechnologie, ce qui inclut les végétaux, les aliments du bétail, les engrais et les produits biologiques vétérinaires. L'ACIA réalise également des inspections et un contrôle après autorisation, de manière à ce que les produits homologués continuent à satisfaire aux normes de qualité et de sécurité. Santé Canada est chargé de l'évaluation de l'innocuité pour la santé des humains des produits issus de la biotechnologie, ce qui inclut les aliments, les produits pharmaceutiques, les cosmétiques, les instruments médicaux, les produits pharmaceutiques vétérinaires ainsi que les produits de lutte contre les ravageurs. Ce ministère est responsable de la fixation des normes en matière de sécurité de l'approvisionnement alimentaire, ce qui inclut les produits alimentaires issus de la biotechnologie (aliments nouveaux). Environnement Canada administre la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement de 1999* (LCPE 1999) de manière à ce que toutes les nouvelles substances (ce qui inclut les produits issus de la biotechnologie) soient évaluées du point de vue de leur incidence nocive potentielle sur l'environnement et la santé des humains. La LCPE de 1999 prévoit actuellement des pouvoirs de réglementation de type général « concernant les produits de la biotechnologie, sauf lorsque d'autres lois ou règlements ministériels incluent des dispositions équivalentes ». Tant la *Loi relative aux aliments du bétail* que la *Loi sur les semences*, administrées par l'ACIA, sont considérées comme équivalentes à la LCPE de 1999.

Dans de nombreux cas, un produit issu de la biotechnologie est évalué sous l'angle de différentes lois et règlements, de sorte que l'évaluation nécessite une coordination entre les ministères et organismes. L'ACIA, Environnement Canada et Santé Canada collaborent à l'évaluation des risques pour la sécurité et de l'incidence environnementale de ces produits.

Le système de réglementation du Canada est basé sur divers principes réglementaires fondamentaux, qui influent sur la législation en matière de biotechnologie et sur les normes d'évaluation de la sécurité. En voici les grandes lignes.

### *Approche fondée sur les sciences*

L'évaluation de la sécurité est basée sur l'examen de l'information relative à la biologie de l'organisme, la technologie utilisée pour le créer et son incidence sur l'environnement et les organismes vivants (ce qui inclut les humains). Les scientifiques de l'ACIA et de Santé Canada sont responsables de l'évaluation critique des données réunies à partir d'expériences en laboratoire et en plein champ et soumises par le demandeur.

### *Approche basée sur les produits*

Le Canada réglemente les produits issus de la biotechnologie en se basant sur leur fonction et leur utilisation, et non sur la façon dont ils sont fabriqués. La décision d'adopter cette approche est basée en partie sur le fait que plusieurs lois canadiennes actuellement en vigueur sont basées sur les produits (p. ex., pour les aliments du bétail, les engrais et les semences). Les responsables de la réglementation ont considéré les nouvelles méthodes de biotechnologie (p. ex., techniques de l'ADN recombinant) comme d'autres moyens de produire de nouvelles lignées de la même famille de produits. Les applications de la biotechnologie ont donc été ajoutées, le cas échéant, aux lois et normes existantes.

### *Familiarité et équivalence substantielle*

La « familiarité » désigne l'utilisation de connaissances sur les caractéristiques d'une espèce et de l'expérience pratique de cette espèce pour rendre des décisions en matière de réglementation. Elle a été utilisée à la fois pour déterminer si un produit doit être analysé, et dans le cadre de son processus d'analyse (p. ex., comparaison d'un organisme modifié avec ses organismes souches ou à des organismes apparentés). La familiarité a mené au concept de l'« équivalence substantielle », qui est utilisé au Canada et dans d'autres compétences. L'équivalence substantielle sert à déterminer, en partie, la façon dont un nouveau produit doit être réglementé. Lorsqu'un végétal ou un produit modifiés sont considérés comme substantiellement équivalents à un végétal ou un produit de contrepartie non modifié, ils sont réglementés de façon similaire. Lorsqu'ils ne sont pas substantiellement équivalents, ils pourront nécessiter une évaluation plus approfondie ou une approche différente pour déterminer leur innocuité.

### *Cas par cas*

Chaque nouveau produit est traité comme un cas unique en raison du fait que chaque combinaison végétal-caractère peut poser des risques uniques.

### *Approche étape par étape*

Les produits sont évalués étape par étape tout au long du processus de mise au point. Cette approche d'évaluation progresse par étapes « du laboratoire à la chambre de

culture et à la serre, puis aux essais en plein champ pour finalement passer aux essais au champ à grande échelle » (OCDE). Le concept consiste à mettre à profit l'information basée sur les étapes réalisées auparavant et à l'affiner.

### *Transparence*

L'ouverture est essentielle du point de vue de l'efficacité du cadre de réglementation. Les intervenants du gouvernement, de l'enseignement, de l'industrie et du public sont consultés au cours de l'élaboration de nouvelles exigences réglementaires. Les responsables de la réglementation informent également le public des décisions prises au moyen des procédures d'évaluation dans des exposés de décision qu'on peut obtenir auprès de l'ACIA à l'adresse :

- <http://www.inspection.gc.ca/francais/plaveg/pbo/ddf.shtml>

### *Approche de précaution*

Nombre d'organismes de réglementation nationaux et internationaux dont le Canada ont adopté une approche de précaution qui constitue l'un des principes essentiels de leurs systèmes de réglementation. L'application du principe de précaution exprime l'idée qu'il ne faut pas invoquer l'absence de certitude scientifique complète pour différer les décisions comportant un risque de préjudice grave ou irréversible. Il se caractérise par trois éléments fondamentaux : la nécessité de prendre une décision, l'existence d'un risque de préjudice grave ou irréversible et l'absence de certitude scientifique absolue.

Le Canada possède des antécédents de longue date en matière d'utilisation de ce principe de précaution dans le système de réglementation fédéral. Le système de réglementation à cet égard est déterminé par les dispositions applicables des lois fédérales, les accords fédéraux-provinciaux exécutoires et les accords internationaux dont le Canada est signataire.

*Le Cadre d'application de la précaution dans un processus décisionnel scientifique en gestion du risque* du Canada peut être obtenu sur le site Web du Bureau du Conseil privé à l'adresse :

- <http://www.pco-bcp.gc.ca>

### *Harmonisation*

Le Canada participe au Groupe du travail sur l'harmonisation de la surveillance réglementaire en biotechnologie de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), ainsi qu'au Groupe d'étude de l'OCDE sur la sécurité des nouveaux aliments destinés à la consommation humaine et animale. Le principal objectif des travaux effectués par ces groupes consiste à élaborer des règlements uniformes en matière de biotechnologie pour tous les pays membres, tout en évitant les entraves au commerce. Le Canada est également intéressé par les initiatives bilatérales. Par exemple, le Canada et les États-Unis ont harmonisé leurs exigences de

données pour les composantes de caractérisation moléculaire du processus d'examen réglementaire qui s'appliquent aux plantes transgéniques. Pour des précisions, voir les Discussions bilatérales Canada-États-Unis sur la biotechnologie agricole à l'adresse :

- <http://www.inspection.gc.ca/francais/plaveg/bio/usda/cdausbilatf.shtml>

Le Protocole de Cartagena sur la biosécurité énonce également des procédures d'harmonisation internationales pour les « mouvements transfrontières d'organismes vivants génétiquement modifiés issus de la biotechnologie moderne » ainsi que leurs répercussions négatives potentielles sur la diversité biologique et la santé des humains. L'annexe III du document énonce l'objectif, l'usage, les principes généraux, la méthodologie d'une évaluation du risque et les points à examiner. Voir :

- <http://www.biodiv.org/biosafety/articles.asp?lg=0&a=bsp-a3>

### **iii) Végétaux à caractères nouveaux (VCN)**

Un VCN est un végétal qui possède un caractère qui n'est pas présent chez les végétaux de même espèce dont il existe déjà au Canada des populations stables et en culture, ou qui est exprimé en dehors de la gamme des caractéristiques similaires existant chez des populations stables et en culture de cette même espèce végétale au Canada. Les VCN peuvent être produits par sélection conventionnelle, mutagenèse ou au moyen de techniques de l'ADN recombinant, comme le génie génétique. À ce jour, plus de 50 VCN ont été approuvés pour dissémination dans l'environnement ou pour l'alimentation du bétail au Canada. Pour l'information la plus récente et des liens avec les descriptions détaillées de chacun de ces VCN approuvés, voir :

- <http://www.inspection.gc.ca/francais/plaveg/bio/VCNvcnf.shtml>

La mise au point d'un VCN comporte plusieurs étapes. Dans la plupart des cas, les végétaux à caractères nouveaux, selon leur histoire et leur utilisation prévue, franchissent étape par étape les stades du confinement, des essais en milieu confiné puis de la demande de dissémination en milieu non confiné, de l'utilisation comme aliments du bétail et de l'approbation de l'innocuité alimentaire. L'objet du présent document consiste à illustrer deux volets de cette étape finale : l'évaluation de l'innocuité en vue de la dissémination dans l'environnement et de l'alimentation du bétail. L'évaluation de l'innocuité pour l'alimentation relève de la responsabilité de Santé Canada et dépasse la portée du présent document (on trouvera des précisions sur le site Web de Santé Canada à l'adresse :

- <http://www.hc-sc.gc.ca/francais/protection/biotech/index.htm>

La plupart des VCN sont conçus dans l'intention d'une dissémination en milieu non confiné et d'une commercialisation. Toutefois, au cours des premières étapes de la mise au point d'un nouveau VCN, les végétaux sont cultivés dans des conditions confinées, dans des chambres de culture en laboratoire ou en serre, avant de faire l'objet d'essais en champ de recherche en milieu confiné. Les essais en champ génèrent de l'information spécifique que les promoteurs doivent réunir et soumettre à l'ACIA avant de faire la demande de dissémination en milieu non confiné du VCN.



Avant que le VCN ne puisse être cultivé au Canada, ou utilisé comme aliment pour le bétail ou pour les humains, diverses autorisations doivent être accordées. Le végétal doit être approuvé pour une dissémination complète dans l'environnement par le Bureau de la biosécurité végétale de l'ACIA, pour utilisation pour l'alimentation du bétail par la Section des aliments du bétail de l'ACIA et pour utilisation pour l'alimentation des humains par Santé Canada. À ce stade, l'évaluation permet de préciser les effets nocifs potentiels associés à la dissémination du VCN. La dissémination en milieu non confiné du végétal présentant un caractère nouveau peut être autorisée avec des conditions spéciales. Par exemple, on peut limiter la culture de certains VCN à certaines régions du Canada. De plus, on doit suivre des plans de gestion de la résistance aux insectes lorsque le VCN est résistant aux ravageurs (p. ex., maïs Bt). On trouvera plus de précisions sur la gestion de la résistance aux insectes à l'adresse :

- [www.inspection.gc.ca/francais/plaveg/bio/bt/bacthuf.shtml](http://www.inspection.gc.ca/francais/plaveg/bio/bt/bacthuf.shtml)

Lorsque le VCN est utilisé pour l'alimentation du bétail, la Section des aliments du bétail de l'ACIA réalisera une évaluation de l'innocuité comme aliment du bétail. On évalue les répercussions potentielles des végétaux modifiés sur la nutrition du bétail et sur le bétail ainsi que les risques en cas d'exposition professionnelle ou fortuite. Les évaluations tiennent compte de l'incidence prévue de la modification, ainsi que des changements non prévus qui peuvent s'être produits.

L'ACIA fournit les documents appelés directives réglementaires qui précisent les exigences des diverses lois et des divers règlements visant les produits de la biotechnologie et expliquent comment s'y conformer. En voici des exemples :

Directive d'homologation Dir94-08 : *Critères d'évaluation du risque environnemental associé aux végétaux à caractères nouveaux*, à l'adresse :

- <http://www.inspection.gc.ca/francais/plaveg/bio/dir/dir9408f.shtml>

Directive de réglementation Dir95-03 : *Directive relative à l'évaluation des végétaux dotés de caractères nouveaux utilisés comme aliments du bétail*, à l'adresse :

- <http://www.inspection.gc.ca/francais/anima/feebet/dir9503f.shtml>

Directive de réglementation Dir2000-7 : *Lignes directrices sur la dissémination dans l'environnement de végétaux à caractères nouveaux dans le cadre d'essais au champ en conditions confinées au Canada*, à l'adresse :

- <http://www.inspection.gc.ca/francais/plaveg/bio/dir/dir0007f.shtml>

Directive de réglementation Dir96-13 : *Exigences phytosanitaires : Permis d'importation de végétaux à caractères nouveaux et de leurs produits*, à l'adresse :

- <http://www.inspection.gc.ca/francais/plaveg/protect/dir/d-96-13f.shtml>

**iv) Exigences en matière de données pour l'approbation de la dissémination dans l'environnement et de l'utilisation pour l'alimentation du bétail**

Pour évaluer l'innocuité des VCN en cas de dissémination dans l'environnement et d'utilisation pour l'alimentation du bétail, les responsables de la réglementation exigent des données détaillées sur chaque végétal modifié. Toutes les données doivent être rigoureuses et rigoureusement scientifiques. Lorsqu'elles sont incomplètes ou inadéquates, le promoteur du produit doit résoudre ces problèmes avant que le processus d'évaluation ne puisse se poursuivre. Les exigences en matière de données peuvent varier. Par exemple, des cultures comme le canola qui peuvent être croisées avec des espèces sauvages apparentées nécessitent plus de données environnementales que les cultures comme le maïs qui n'ont pas de plantes indigènes apparentées au Canada.

L'information requise pour les évaluations de l'innocuité peuvent inclure des données de base sur l'identification et la classification du végétal, la méthode de modification génétique, des analyses moléculaires détaillées, des données sur la composition et la nutrition, et des données environnementales (effets et devenir). Dans certains cas, les évaluateurs gouvernementaux sous-traiteront également des études ou réuniront des groupes d'experts afin de réunir des précisions sur des types précis de produits, ce qui inclut des recherches sur leur interaction potentielle avec l'environnement.

Suit une description des données requises durant les évaluations de l'innocuité pour l'environnement ou pour l'alimentation. On trouvera de l'information détaillée dans la Directive d'homologation Dir94-08 : *Critères d'évaluation du risque environnemental associé aux végétaux à caractères nouveaux*, à l'adresse

- <http://www.inspection.gc.ca/francais/plaveg/bio/dir/dir9408f.shtml>

et dans la Directive de réglementation Dir95-03 : *Directive relative à l'évaluation des végétaux dotés de caractères nouveaux utilisés comme aliments du bétail*, à l'adresse :

- <http://www.inspection.gc.ca/francais/anima/feebet/dir9503f.shtml>

Le demandeur est tenu de présenter à l'ACIA autant de données que l'on exige pour satisfaire aux critères d'évaluation. (À noter que les évaluations de l'innocuité alimentaire sont réalisées par Santé Canada et que les données associées à ces évaluations ne sont pas incluses dans ce document.) Les présentations incluent de l'information détaillée sur le végétal qui a été modifié, ainsi que sur ses schèmes d'utilisation typique et sur l'utilisation prévue du végétal présentant des caractères nouveaux. À des fins d'illustration, ils sont catégorisés et décrits brièvement ci-dessous.

### *Biologie de l'espèce végétale*

Pour des raisons essentiellement pratiques, l'espèce végétale qui a été modifiée comprend généralement une espèce qui est largement cultivée au Canada (ou utilisée commercialement) et, de ce fait, il existe toute une somme d'informations de référence sur la biologie et la culture de l'espèce végétale en question, ainsi que sur ses profils d'utilisation. Pour les espèces végétales qui ont été modifiées par ajout d'un caractère nouveau, l'information fournie inclut de l'information de base sur le végétal et ses

caractéristiques particulières. Une grande partie de cette information est aujourd'hui définie pour chacune des grandes espèces végétales et se trouve dans les cahiers parallèles propres à chacune. Voir :

- <http://www.inspection.gc.ca/francais/plaveg/bio/biodocf.shtml>.

De plus, lorsqu'une utilisation « non familière » est envisagée, on exige une explication détaillée de cette utilisation. Typiquement, l'information requise inclut :

- le nom et la taxonomie;
- l'histoire ou la généalogie, ou toute autre information sur l'organisme qui définit son caractère unique;
- le mode d'utilisation (l'application);
- l'historique de l'utilisation comme aliment pour les animaux.

### *Modification génétique*

On exige de l'information détaillée qui décrit la modification génétique, les techniques utilisées et la caractérisation de la qualité de la modification. Nombre de techniques différentes peuvent être utilisées pour mettre au point un végétal présentant un caractère nouveau. Elles incluent la sélection traditionnelle, les techniques de l'ADN recombinant (comme le génie génétique), la mutagenèse, la transformation et la fusion cellulaire. Les données sur la modification incluent les éléments suivants :

- la description de la technique de modification utilisée;
- l'identification de tout le matériel génétique potentiellement fourni à la plante hôte;
- l'information sur le processus et l'ADN utilisés pour modifier le végétal (p. ex., plasmides, identité, fonction prévue) ce qui inclut les intermédiaires (p. ex., bactéries);
- la description de l'ADN à introduire (p. ex., caractérisation, taille, emplacement et orientation dans le vecteur/la construction finale, fonction).

On peut trouver les techniques de base de l'ADN recombinant et de courts guides d'introduction aux techniques de l'ADN recombinant aux adresses suivantes :

- [http://www.genome.ou.edu/protocol\\_book/protocol\\_index.html](http://www.genome.ou.edu/protocol_book/protocol_index.html)
- <http://www.cas.vanderbilt.edu/bsci111b/recom-1/supplemental.htm>

et en utilisant les liens fournis.

Pour les plantes modifiées par un processus non recombinant, on exige une explication détaillée du processus utilisé. Ces autres processus peuvent nécessiter de l'information technique supplémentaire, qui doit être soumise de manière à ce que l'ACIA possède une description complète des méthodes utilisées.

Pour les procédures qui supposent le recours à une transformation végétale, une explication détaillée, ce qui inclut des références scientifiques sur le processus, doit être fournie. Un bref aperçu des détails de la transformation de l'espèce végétale figure sur les sites suivants :

- <http://opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MGW4/MG4373.html>
- <http://www.nuffieldbioethics.org/publications/gmcrops/rep0000000086.asp>

Les végétaux présentant des caractères nouveaux qui font l'objet d'une demande d'examen réglementaire font l'objet d'une caractérisation moléculaire détaillée. Cela inclut les caractérisations du ou des gènes, après insertion dans le génome végétal, ainsi que l'intégrité du gène et son activité dans des conditions typiques.

Un VCN peut avoir plusieurs caractères nouveaux. Les caractères nouveaux peuvent découler de l'insertion d'un gène dans le végétal. Pour chaque gène inséré dans un produit végétal nouveau, ce qui inclut les gènes marqueurs, on requiert les données suivantes :

- le mode d'expression du gène (p. ex., stabilité, spécificité tissulaire de l'expression, niveaux d'expression, etc.);
- la description des produits de dégradation;
- la toxicité ou l'interaction avec d'autres organismes connus;
- le potentiel allergène.

Les VCN sont caractérisés en fonction de leur équivalence avec des végétaux non modifiés de la même variété; le produit du gène lui-même est caractérisé dans le végétal et tout changement potentiel de la physiologie, de la biologie ou de la biochimie végétal est noté. Dans le cas d'un gène inséré, le devenir du produit génétique nouveau est étudié tout au long du cycle de vie du végétal, en observant son expression et son catabolisme.

Une proportion importante de cette information est présentée sous forme de données de biologie moléculaire, qui inclut des techniques comme la technique de transfert de Southern, la technique de transfert Northern, la technique de transfert de Western et ELISA, qui permettent la détection de gènes uniques, la quantification de l'expression d'un gène unique, et la mise en évidence de produits protéiques. Pour l'examen des diverses techniques d'analyse, et la compréhension de la façon dont ces techniques sont interprétées et utilisées pour produire des données, veuillez vous reporter aux sites suivants :

- <http://www.botany.uwc.ac.za/mirrors/MIT-bio/bio/rdna/rdna.html>
- <http://www.mcb.uct.ac.za/manual/MolBioManual.htm>
- <http://www.dnalc.org/resources/BiologyAnimationLibrary.htm>
- <http://www.lsic.ucla.edu/l3/tutorials/>

### *Environnement*

Les végétaux modifiés destinés à une dissémination dans l'environnement sont examinés afin de déceler leurs interactions avec les écosystèmes dans lesquels ils sont

utilisés, ainsi que leur impact sur ceux-ci. Les données peuvent combiner la documentation consacrée au végétal (p. ex., période de floraison, production de semences) ainsi que les données des essais en laboratoire ou en serre ou des essais en champ (p. ex., potentiel que le végétal devienne une mauvaise herbe ou une plante nuisible).

Les critères suivants servent à évaluer les interactions des VCN dans l'environnement :

- le végétal est-il susceptible de devenir une plante nuisible pour l'agriculture ou une plante invasive d'habitats naturels?
- y a-t-il des possibilités de flux génétique vers des plantes sauvages compatibles, dont les lignées hybrides pourraient devenir plus nuisibles ou invasives?
- le végétal est-il susceptible de devenir un ravageur végétal?
- y a-t-il possibilité d'incidence sur des organismes non visés?
- y a-t-il possibilité d'incidence sur la biodiversité?
- lorsque l'expression du végétal est insecticide, un plan de gestion de la résistance aux insectes est-il en place?

Cette information est souvent réunie dans le cadre de plusieurs années d'essais à différents niveaux d'exposition dans l'environnement. Par exemple, les végétaux modifiés pour résister aux insectes et aux ravageurs microbiens ne sont pas seulement évalués pour leur résistance, mais également pour leur effet sur l'environnement global, ce qui inclut l'environnement édaphique [qui a rapport au sol] et l'incidence sur les ravageurs non visés. L'élaboration de données qui définissent avec exactitude les répercussions environnementales d'un végétal présentant des caractères nouveaux constitue un volet crucial du processus d'évaluation. À l'heure actuelle, on constate un degré élevé de compréhension du processus d'évaluation environnementale pour certains caractères, alors que d'autres caractères qui peuvent s'avérer de nature plus complexe nécessiteront des travaux suivis et des études plus approfondies pour comprendre toutes les répercussions environnementales.

En complément de l'élaboration de données qui décrivent l'interaction du végétal modifié avec l'environnement, les promoteurs d'un VCN introduisent des données reliées aux propriétés agronomiques et à d'autres aspects pratiques de la culture. Au nombre des exemples figurent les possibilités que le végétal devienne une plante nuisible ou un ravageur; une évaluation du VCN en comparaison de plantes non modifiées, en termes de reproduction, de survie, d'adaptation, de réaction au stress, de flux génétique par croisement extérieur; et d'impact sur les organismes non visés.

*Alimentation du bétail*

Les données doivent être soumises pour déterminer l'impact du végétal modifié sur le bétail et sa nutrition, ainsi que l'impact potentiel en cas d'exposition professionnelle ou fortuite aux aliments.

De l'information nutritionnelle est requise pour les VCN qui seront utilisés pour l'alimentation du bétail. Les données exigées peuvent inclure : des mesures des composants nutritifs de base, du gras et des fibres protéiniques; des données sur la composition des lipides totaux, la fraction glucidique, les minéraux et les composants antinutritionnels comme les phytates ou les inhibiteurs de la trypsine.

L'exposition alimentaire à l'aliment pour le bétail nouveau est l'un des points faisant l'objet de l'évaluation de l'innocuité. Les aliments qui sont présents en faibles concentrations dans une alimentation complète peuvent être moins préoccupants que ceux qui visent à devenir une composante importante de l'alimentation.

Les données sur la toxicité et l'allergénicité des VCN qui seront utilisés pour l'alimentation du bétail sont tirées de l'information sur les produits et des études en laboratoire. L'information requise dépend des caractéristiques du végétal modifié et des substances nouvelles qu'il exprime. L'information peut inclure des données sur les éléments suivants :

- la concentration de la substance nouvelle dans des parties comestibles;
- la comparaison des séquences d'acides aminés et les similitudes avec des toxines connues;
- la stabilité au traitement thermique ou à d'autres méthodes de transformation;
- la dégradation dans des systèmes gastriques et intestinaux modèles représentatifs;
- le potentiel allergène des produits géniques;
- le potentiel toxique des produits géniques.

Le potentiel de réponse allergène chez les humains qui seraient exposés aux aliments du bétail, dans leur milieu de travail par exemple, sera examiné à partir de l'historique des organismes hôtes et donneurs ainsi que des caractères nouveaux introduits.

### *Techniques*

Il mérite d'être souligné que les outils et techniques d'analyse utilisés pour la collecte des données changent continuellement. Une grande partie des données exposées dans la présente étude pour illustrer le processus d'évaluation a été soumise il y a déjà plusieurs années. Aussi, de nouvelles données soumises à l'appui d'une nouvelle demande pourraient être réunies et présentées sous une forme différente. Même si de nouvelles techniques peuvent être utilisées pour générer des données, l'interprétation essentielle des données suivra un chemin similaire à celui qui est décrit ici.

## **2.0) La fiche technique**

La fiche technique montre le type de données utilisées pour l'évaluation de l'innocuité d'un végétal présentant un caractère nouveau, qui est destiné à la dissémination dans un milieu non confiné et à l'alimentation du bétail, évaluation réalisée par l'ACIA. Veuillez noter que Santé Canada est responsable des évaluations de la salubrité des aliments et que l'on peut trouver l'information concernant ce volet de la réglementation en biotechnologie à l'adresse :

- <http://www.hc-sc.gc.ca/francais/protection/biotech/index.htm>

La fiche technique est basée sur l'évaluation du maïs modifié pour être tolérant aux insectes par insertion et expression du gène *Bacillus thuringiensis* (Bt). Cette information, fournie par Monsanto Canada Inc., illustre la mise au point d'un VCN par utilisation de la transformation biolistique, de manière à incorporer une copie unique d'un gène Bt dans le génome du maïs.

À des fins d'illustration, le présent document utilise l'information présentée pour l'évaluation de l'innocuité de ce maïs résistant aux insectes modifiés génétiquement. Les pages qui suivent fournissent des exemples des données soumises, de leur nature et de leur interprétation dans les domaines suivants :

- la description du caractère nouveau;
- la caractérisation de la modification génétique;
- l'évaluation environnementale;
- l'évaluation de l'aliment du bétail.

L'information requise et évaluée pour ces sections est résumée. Dans chacun de ces différents domaines, la nature de l'information elle-même et les techniques utilisées pour produire les données sont décrites en détail.

On invite le lecteur à se reporter au site Web de l'ACIA pour de l'information détaillée et des réponses aux questions générales concernant le processus de réglementation :

- <http://www.inspection.gc.ca/francais/plaveg/pbo/pbobbvf.shtml>

### **3.0) Détails de la fiche technique**

#### ***i) Description et évaluation du caractère nouveau***

Les exigences d'information reliées à la description et à l'évaluation du caractère nouveau figurent dans les directives de réglementation Dir94-08 *Critères d'évaluation du risque environnemental associé aux végétaux à caractères nouveaux* et Dir95-03 *Directive relative à l'évaluation des végétaux dotés de caractères nouveaux utilisés comme aliments du bétail*; elles sont axées sur la biologie moléculaire du caractère et les mécanismes qui ont été utilisés pour modifier le végétal. Les directives énoncent un certain nombre d'exigences communes, même s'il y a des exigences uniques propres à l'évaluation de l'innocuité pour l'alimentation du bétail. La présente section énonce ces exigences.

Aux termes de la Dir94-08, on recueille l'information suivante sur le VCN :

- la taxonomie du végétal (nom scientifique et populaire);
- la désignation commune du VCN, y compris tous les synonymes;
- la généalogie du VCN, y compris toute relation avec un VCN ayant déjà fait l'objet d'une évaluation;
- l'utilisation prévue du VCN.

L'information secondaire inclut :

- la description des produits géniques nouveaux qui confèrent au VCN ses caractères nouveaux;
- les méthodes utilisées pour introduire les caractères nouveaux.

Lorsque des techniques de l'ADN recombinant ont été utilisées, on requiert également une carte de chaque création génique et les détails des gènes, ce qui inclut :

- les autres gènes marqueurs;
- les séquences de réglementation;
- toutes autres séquences d'ADN;
- le nom du vecteur;
- les caractéristiques.

Les autres données incluent le génome parental dans lequel se situe la modification génétique (pour les VCN allopolyploïdes), le nombre de générations survenues depuis la modification originale et l'information sur la stabilisation de chaque modification génique et de son expression.

Les autres données requises incluent l'information concernant les produits géniques limités à certains tissus ou exprimés à un certain stade de développement ou induits. On demande également l'activité des produits géniques et des produits de dégradation et dérivés dans la plante hôte, ainsi que changement apporté aux voies métaboliques que l'on a observé ou que l'on anticipe. Les données requises sur la toxicité incluent les risques de toxino-génèse pour les prédateurs, brouteurs, parasites, pathogènes, compétiteurs et symbiotes, les risques d'effets nuisibles pour la santé humaine et la voie la plus probable d'exposition aux produits géniques, aux produits de dégradation et aux dérivés.

Les données complémentaires requises pour les évaluations des aliments du bétail selon la description figurant dans la Dir95-03, qui sont distinctes des données décrites ci-dessus, incluent :

- la détermination du niveau d'expression du gène dans toutes les parties du végétal susceptibles de servir d'aliment du bétail;
- l'activité du ou des produits du gène, de leurs produits de dégradation et de leurs dérivés dans le végétal-hôte, ainsi que toute modification des voies métaboliques existantes (y compris de celles se traduisant par une modification de l'accumulation ou du stockage);



- la probabilité d'exposition des humains et du bétail, y compris une estimation du niveau et de la voie de l'exposition aux produits du gène, à leurs produits de dégradation et à leurs dérivés;
- le risque d'effets négatifs pour les humains et le bétail, y compris le risque d'exposition à des toxines et à des facteurs antinutritionnels, ainsi que le risque d'irritation et d'allergie pour les humains (en cas d'exposition professionnelle).

Lorsque la modification se traduit par la production de nouveaux produits protéiques, on doit fournir, le cas échéant, une description des similitudes existant avec les produits provenant de sources traditionnelles. Lorsque la modification génétique s'est traduite par un changement de l'expression d'autres constituants normaux du végétal, on doit fournir suffisamment d'information sur les voies cataboliques et anaboliques empruntées par le produit pour permettre une évaluation du risque d'effets secondaires sur les voies métaboliques connexes et sur la production de métabolites. Tout marqueur pour la transformation utilisé pour la mise au point de la variété doit être identifié. Lorsqu'il y a des effets secondaires sur la biochimie, la physiologie et le métabolisme secondaire de la plante hôte, ils doivent être caractérisés. L'information sur les conséquences pour le végétal final doit être fournie.

L'évaluation concrète du caractère nouveau dépendra fortement de la nature du caractère lui-même. Pour les traits qui ont des antécédents en matière d'utilisation sécuritaire, qui ont été bien décrits et compris, l'évaluation pourra être relativement simple. Le gène Bt en constitue un exemple. Une somme importante de données a été accumulée sur de nombreux aspects de l'utilisation du Bt et cela constitue un point de départ pratique de l'évaluation du VCN. Il existe des différences d'expression entre un gène Bt inséré dans les végétaux et l'utilisation traditionnelle du Bt appliqué, mais la familiarisation avec les produits du Bt fournit un solide point de comparaison. Toutefois, il doit être entendu qu'il n'existe qu'un nombre limité de caractères qui ont une longue histoire d'utilisation sécuritaire. Tous les caractères nouvellement modifiés nécessitent l'élaboration d'un dossier adéquat pour l'évaluation.

### *Données de l'exemple*

Dans le cadre de l'évaluation, des données sont soumises concernant la plante-hôte elle-même (voir annexe A : Cultures vivrières) ainsi que la nature du caractère introduit. Dans l'exemple de l'utilisation du Bt, les antécédents d'utilisation sans danger et la familiarisation avec le caractère nouveau fournissent des données de référence utiles pour effectuer une revue de l'évaluation (voir annexe B : Familiarisation avec les caractères nouveaux). Lors de l'évaluation du caractère nouveau, il importe d'acquérir une compréhension du mode d'action. La capacité d'effectuer des choix informés concernant les tests essentiels qui sont requis pour prouver que le caractère nouveau fournira l'effet prévu dépend de cette compréhension. Par exemple, lorsque le caractère nouveau exprime une résistance aux insectes, il faut disposer d'information de référence adéquate concernant l'efficacité et le mode d'action de la protéine de résistance aux insectes pour élaborer le contexte dans lequel l'évaluation est réalisée

au niveau du plant entier. De manière similaire, pour un caractère qui exprime une tolérance aux herbicides, le mode d'action de l'herbicide, les effets secondaires potentiels, ainsi que l'activité du gène de tolérance lui-même doivent être bien compris afin de concevoir des mécanismes pour permettre une évaluation cruciale de la fonctionnalité de ce caractère nouveau dans le plant entier et en cas de dissémination élargie dans l'environnement.

La nature de la construction d'ADN du caractère est également essentielle. Même s'il existe une documentation scientifique importante qui décrit les divers gènes et composants d'ADN, le demandeur doit fournir une description détaillée de la construction génétique et de ses composantes (voir annexe C : Constructions génétiques). En cas d'antécédents d'utilisation de ces éléments génétiques particuliers pour les espèces végétales qui sont évaluées, l'information de référence devra également être disponible.

L'expression et la stabilité du caractère nouveau et la généalogie du VCN sont également des points importants. Des données représentatives qui expliquent ces caractéristiques du VCN sont décrites (voir annexe D : Expression).

## ***ii) Caractérisation de la modification génétique***

Un dossier d'information principal est consacré à la description du caractère nouveau et des constructions génétiques (ou méthodes) utilisées pour conférer le caractère nouveau. Un nouvel élément génétique recombinant comprend généralement un promoteur (région qui contrôle l'expression de l'ADN, adjacent à la région codante), une région codante (qui peut comprendre une séquence de codification de protéines ou une séquence qui est transcrite en ARN qui peut affecter la fonction d'une cellule végétale), et une séquence de terminaison qui définit le stade final de la transcription de l'ADN. La combinaison des trois éléments (promoteur, région codante et terminaison) est appelée gène. Les gènes sont généralement propagés dans des vecteurs de clonage plasmidiques, qui permettent leur manipulation, leur séquençage et d'autres types de modification de manière pratique. Le gène lui-même peut être retiré sous forme de fragment intact et transféré soit à un vecteur de transformation utilisé par *Agrobacterium*, ou incorporé à un plasmide qui est ensuite utilisé pour la transformation au moyen du processus biolistique.

Les lignes directrices de réglementation 94-08 et 95-03 informent les demandeurs qu'ils ont également le devoir de fournir toute information sur la modification qui peut inclure les produits géniques nouveaux qui confèrent des caractères nouveaux et les méthodes utilisées pour introduire les caractères nouveaux. Lorsque la modification a été obtenue au moyen de techniques de l'ADN recombinant, on doit fournir les détails de la construction génétique et du mode de transformation. Des précisions sont nécessaires sur l'analyse de la modification génétique au sein du VCN lui-même. Cela inclut de l'information sur le nombre de copies géniques du caractère nouveau et les méthodes utilisées pour introduire la modification dans la variété commerciale (p. ex., information

sur la généalogie). La description de la modification génétique elle-même constitue le principal élément de cette partie des données.

Les données qui permettent l'évaluation de la modification génétique incluent l'analyse visant à préciser le nombre de copies et la configuration du gène inséré, et à vérifier s'il n'existe pas de copies partielles ou fragmentées du gène présentes dans d'autres régions du génome de la plante. On doit fournir les données relatives au processus de transformation, les méthodes utilisées pour sélectionner le végétal qui porte la modification génétique et toute autre information pertinente sur la mise au point du VCN.

#### *Exemple de données*

Il faut donner une caractérisation détaillée du gène inséré et du vecteur plasmidique qui porte ce gène. Dans l'exemple fourni, le gène est contenu dans un vecteur de clonage plasmidique qui est ensuite utilisé pour la transformation au moyen du processus biolistique (voir annexe E : Processus de transformation). La cartographie de restriction détaillée ou caractérisation de la PCR de l'insert génétique démontre que le gène a été inséré tel que prévu à l'origine.

Les résultats de la technique de Southern dans ce sommaire (voir annexe F : Caractérisation moléculaire) font la démonstration que le VCN renferme seulement le gène codant le caractère nouveau, et aucun gène de la sélection.

Sont également fournies des données qui illustrent que le gène codant le caractère nouveau s'exprime convenablement et produit une protéine qui est identique à celle qui est prévue et possède les caractéristiques et propriétés adéquates (voir annexe G : Intégrité des caractères).

En raison de la faible expression de cette protéine dans le maïs modifié, il a été nécessaire de produire la protéine au moyen d'un système d'expression bactérien, afin d'obtenir suffisamment de matériel pour effectuer les diverses études de toxicité requises pour satisfaire aux exigences réglementaires. L'équivalence des protéines bactériennes et des protéines produites par le végétal est démontrée à l'annexe G.

### **iii) Critères d'évaluation environnementale**

L'objet global des données réunies dans le cadre de cette partie de l'évaluation consiste à déterminer :

- la possibilité que le VCN se comporte comme une mauvaise herbe en agriculture ou qu'il envahisse les habitats naturels;
- le risque de flux génétique vers des espèces sauvages apparentées, avec risque de production de descendants hybrides susceptibles de devenir des mauvaises herbes difficiles à combattre ou d'être plus envahissants;
- la possibilité que le VCN devienne lui-même nuisible;
- l'incidence possible du VCN ou de ses produits géniques sur des espèces non visées, y compris les humains;
- l'incidence possible sur la biodiversité.

Les données prises en compte dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental des VCN incluent la mise en évidence des inquiétudes potentielles, l'information requise et les procédures d'évaluation des répercussions environnementales possibles associées à la dissémination en milieu non confiné des VCN. Les critères d'évaluation sont conçus pour servir en combinaison avec les cahiers parallèles propres à l'espèce, qui décrivent la biologie de l'espèce à laquelle appartient le végétal modifié, ce qui inclut les détails d'autres formes de vie avec lesquelles il interagit.

L'information qui doit être évaluée inclut :

#### La biologie et l'interaction du VCN

La mise en évidence des différences prévues ou observées entre le VCN et la forme non modifiée ou une contrepartie dénommée (ou un génotype apparenté, ou un ensemble de contreparties dénommées de type végétal semblable) vise à déterminer s'il y a des interactions sensiblement différentes ou altérées avec d'autres formes de vie qui découlent des produits géniques nouveaux et qui pourraient faire que le VCN devienne une mauvaise herbe pour l'agriculture, devienne invasif pour les habitats naturels, ou soit par ailleurs nocif pour l'environnement.

L'information spécifique inclut :

- la biologie de la reproduction et de la survie;
- l'adaptation aux facteurs de stress (pour les facteurs biotiques, énumérer les organismes avec lesquels le VCN a des interactions modifiées);
- la biochimie des produits géniques nouveaux dans la toxicité est connue;
- la description de la probabilité de changement des taux d'exposition des consommateurs, de la microflore du sol et des symbiotes fauniques.

Des études résiduelles peuvent être effectuées pour déterminer les changements macroscopiques, et de l'information supplémentaire sur l'expression phénotypique relative du VCN est également requise.

### Les interactions du VCN

L'information de cette section doit décrire clairement les méthodes utilisées pour obtenir l'information, ainsi que les références bibliographiques, ce qui inclut les numéros de brevets s'il y a lieu. L'information inclura les caractéristiques végétales dans l'environnement, notamment :

- la durée de vie (plante annuelle, biennale ou vivace);
- la vigueur végétative (biomasse);
- le taux de survie hivernale (comptage des plantes);
- la période de floraison;
- la précocité;
- la production de graines;
- la dormance;
- les caractéristiques de la reproduction;
- la fréquence d'alofécondation intraspécifique;
- les vecteurs de pollinisation croisée;
- la fertilité (mâle et femelle);
- l'autocompatibilité;
- la reproduction asexuée;
- les adaptations au stress;
- les effets résiduels;
- la composition;
- les toxines naturelles;
- les toxines introduites;
- toute autre observation.

L'information réunie sur les pratiques agricoles et sylvicoles inclura :

- les endroits proposés pour la dissémination du VCN, si la modification se traduit par la culture du VCN à l'extérieur de la zone de production normale de l'espèce ou à l'extérieur de l'habitat habituel de celle-ci (p. ex., terres agricoles cultivées);
- l'information relative aux différences dans les pratiques culturales et dans les procédures de contrôle et de réduction du risque;
- les méthodes employées après la récolte, y compris procédures d'élimination de la matière végétale laissée au champ.

De l'information complémentaire pourra être requise sur les incidences environnementales possibles, comme le risque que le végétal ne devienne nuisible ou ne devienne directement un ravageur.

### *Exemple de données*

Le type de données examinées inclut l'information relative à la biologie du VCN dans des conditions d'exposition environnementale type (voir annexe H : Données agronomiques), ce qui inclut les données agronomiques et les caractéristiques générales du végétal.

Les données supplémentaires incluent de l'information sur les interactions du VCN, comme la biologie de la reproduction et de la survie, l'adaptation au stress, et le flux génétique (voir annexe I : Interactions avec l'environnement). Ces données sont généralement comparées à des données de nature identique pour un végétal de la même espèce ou d'une variété équivalente.

Des données qui décrivent l'interaction du VCN avec des organismes non visés, les effets sur la biodiversité et le devenir environnemental du produit du VCN sont également fournies (voir annexe J : Intégrité des caractères).

Suit en dernier lieu une discussion concernant l'incidence sur les pratiques de production (culture) (voir annexe K : Culture). Dans le cas des cultures résistantes aux insectes, il faut également suivre les lignes directrices de gestion de la résistance aux insectes.

#### ***iv) Critères d'évaluation des risques pour l'alimentation du bétail***

Le principal objet de l'évaluation des risques pour l'alimentation du bétail correspond à l'incidence du VCN ou du produit du VCN sur le bétail et les travailleurs agricoles. Une vaste gamme de modifications est possible, au moyen à la fois de la sélection traditionnelle et du génie génétique. Ces modifications peuvent introduire de manière accidentelle des composés toxiques, causer des effets secondaires, et provoquer des changements de caractéristiques en matière de nutrition et de nocivité de l'aliment, pouvant entraîner des préoccupations en matière de sécurité. Pour assurer qu'on répond à ces préoccupations, on doit démontrer une claire compréhension du ou des caractères nouveaux, ce qui est déterminé partiellement par l'information étudiée précédemment. L'un des principes directeurs de l'évaluation de l'innocuité pour l'alimentation du bétail consiste à comparer les données moléculaires, compositionnelles et nutritionnelles des produits issus de la plante modifiée à celles de contreparties traditionnelles. Lorsque la similitude ou le degré d'équivalence ne peuvent être déterminés, il est nécessaire d'effectuer une évaluation plus approfondie de l'innocuité pour l'alimentation et de l'efficacité.

La caractérisation détaillée des données doit être générée au moyen de lignées transformées et génétiquement stables qui sont représentatives du produit alimentaire final. Suffisamment de données doivent être soumises pour caractériser le végétal modifié et permettre la comparaison avec une contrepartie conventionnelle ou non modifiée. La plupart des questions relatives à la caractérisation du végétal modifié peuvent être résolues au moyen de données qui peuvent avoir été générées au cours de l'étape de mise au point. La présence et le niveau de composés toxiques ou antinutritionnels provenant de végétaux nouveaux conçus à partir de lignées parentales ou de vecteurs réputés exprimer ces substances sont des thèmes de préoccupation particulière. On devrait examiner l'information pertinente concernant les organismes donneurs et hôtes et inclure une évaluation critique de la capacité des organismes donneurs et hôtes de produire des composés potentiellement toxiques, ainsi que des

données disponibles sur la toxicologie et les antécédents d'utilisation sécuritaire dans des aliments du bétail provenant de la plante hôte et de variétés apparentées utilisées pour mettre au point le végétal modifié.

Le matériel nouvellement exprimé, qui est soit introduit soit du matériel indigène modifié, doit être évalué de manière à fournir l'information suivante :

- le(s) produit(s) génique(s);
- les produits de dégradation, dérivés et leurs voies métaboliques;
- la détermination du niveau d'expression du gène dans toutes les parties végétales qui peuvent être données au bétail pour son alimentation
- l'activité du ou des produit(s) génique(s);
- les produits de dégradation et dérivés dans la plante hôte, et tout changement qui en découle affectant les voies métaboliques existantes (ce qui inclut le mode d'accumulation et de stockage des matières de réserve);
- le risque d'exposition des humains et du bétail, ce qui inclut le niveau estimé et la voie la plus probable de l'exposition aux produits géniques, aux produits de dégradation et aux sous-produits géniques;
- le risque d'effets secondaires pour les humains et le bétail, y compris le risque d'exposition à des toxines ou à des facteurs antinutritionnels, ainsi que le risque d'irritation et d'allergie pour les humains (en cas d'exposition professionnelle).

Lorsque la modification a pour résultat la production de composés protéiques nouveaux, on doit décrire, le cas échéant, la similitude avec des produits provenant de sources traditionnelles . Lorsque les modifications génétiques se traduisent par un changement de l'expression d'autres constituants normaux du végétal, on doit fournir suffisamment d'information sur les voies cataboliques ou anaboliques empruntées par le produit pour permettre une évaluation du risque d'effets secondaires sur les voies métaboliques connexes et sur la production de métabolites.

On doit déterminer le risque qu'un gène de résistance aux antibiotiques introduit, généralement utilisé comme marqueur de sélection durant la transformation du végétal, ait un effet sur les antibiotiques ajoutés aux aliments ou risque d'inactiver ces antibiotiques pendant l'entreposage.

En complément de cette information, les dossiers soumis doivent être accompagnés de données adéquates qui démontrent qu'il n'y a pas de changements importants dans la composition nutritionnelle du ou des produits d'alimentation du bétail, par rapport à la composition de produits qui proviennent de sources actuellement autorisées. Lorsque la composition de l'ingrédient alimentaire proposé n'est pas jugée substantiellement équivalente à celle d'un ingrédient alimentaire actuellement accepté, des données supplémentaires sur la nutrition sont exigées. La nature des données exigées dépendra de la nature et du degré de différence avec l'ingrédient alimentaire provenant d'une source autorisée. Les analyses suivantes doivent être réalisées sur tous les aliments du bétail dérivés de végétaux à caractères nouveaux :

- la teneur en protéines brutes;

- la teneur en lipides bruts;
- la teneur en fibres alimentaires, teneur en chaque catégorie de fibre, en fibres au détergent acide (FDA) et en fibres au détergent neutre (FDN).

Une comparaison statistique de ces éléments nutritifs doit être effectuée, et les données brutes de même que les sorties sur imprimante de l'analyse statistique doivent être jointes à la demande.

Le demandeur doit fournir une description des ingrédients alimentaires et de l'information détaillée sur les méthodes de transformation et les utilisations proposées. De l'information complémentaire pourrait être requise, notamment :

- la composition en protéines vraies, en composés ajoutés non protéiques et en acides aminés;
- la composition quantitative et qualitative en lipides totaux et la teneur dans chaque type d'acide gras;
- la composition de la fraction glucidique; la composition qualitative et quantitative de vitamines (c.-à-d. dans chaque type de vitamine);
- l'analyse de la teneur en minéraux;
- la présence naturelle ou fortuite de facteurs antinutritionnels, dont on pourrait raisonnablement prévoir la présence (p. ex., phytates, inhibiteurs de la trypsine, alcaloïdes, pigments, etc.);
- de l'information sur l'exposition du régime alimentaire, la toxicologie et les essais sur l'alimentation de bétail pourra également être soumise.

### *Exemple de données*

La nature des données soumises dans cette partie de l'évaluation inclura de l'information sur la toxicité de la protéine exprimée dans un VCN (voir annexe L : Toxicité et allergénicité), des études sur l'alimentation du bétail (voir annexe M : Alimentation du bétail), et des données compositionnelles (voir annexe N : Données compositionnelles).

Les données compositionnelles doivent être produites pour le VCN et elles doivent être comparées à un végétal non modifié cultivé au même emplacement (voir annexe N : Données compositionnelles).

On peut trouver des documents faisant consensus sur les nutriments et toxines clés des diverses plantes culturales auprès de l'Organisation de coopération et de développement économiques, à l'adresse :

- [www.oecd.org/ehs](http://www.oecd.org/ehs)

Les données compositionnelles doivent être produites au moyen de concepts expérimentaux judicieux et de méthodes analytiques reconnues, notamment ceux qui sont publiés par AOAC International à l'adresse :

- [http://www.aoac.org/pubs/oma\\_revised.htm](http://www.aoac.org/pubs/oma_revised.htm)



Il pourra également être utile de comparer la composition nutritionnelle du VCN avec des bases de données sur les nutriments publiés par des organismes tels que le National Research Council (États-Unis) ou le Agricultural Research Council (Royaume Uni).

#### 4.0) Nouvelles exigences en matière d'information

L'ACIA peut élaborer de nouvelles exigences en matière d'information et elle examine les données sur les nouveaux produits qui sont divulguées. De plus, au cas par cas, l'ACIA peut effectuer des vérifications et des études supplémentaires concernant les thèmes d'intérêt en biotechnologie. Ainsi, les scientifiques de l'ACIA élaborent une base de connaissances plus étoffée en matière de réglementation et se tiennent informés de tous les changements dans le domaine scientifique. Par exemple, l'ACIA a parrainé des études sur l'effet du maïs Bt sur les insectes et sur la gestion de la résistance des herbicides pour les VCN.

De plus, l'ACIA examine les données scientifiques complémentaires au fur et à mesure qu'elles sont divulguées et analyse cette information dans le contexte des évaluations de l'innocuité effectuées précédemment. Cela a eu lieu lorsque le promoteur d'un VCN soumet de nouvelles constatations scientifiques à l'attention de l'ACIA. Dans certains cas, les approbations peuvent être prolongées, ou le gouvernement a le droit d'imposer des restrictions à l'utilisation du VCN ou d'annuler son approbation. Par exemple, voir le site :

- <http://www.inspection.gc.ca/francais/sci/biotech/tech/greenroundf.shtml>

***Les données utilisées dans cet exemple de présentation et dans la présente fiche technique sont considérées comme à jour, exactes et ne faisant l'objet d'aucun examen complémentaire.***

#### Avis de non responsabilité

*Le document « exemple de présentation : fiche technique » est offert à titre de service public afin de fournir des renseignements sur le type de données que l'ACIA exige pour évaluer de nouveaux végétaux à caractères nouveaux. Même si l'ACIA a mis beaucoup de soins à la préparation du document « exemple de présentation : fiche technique » publié sur le présent site, elle ne peut garantir son exactitude, son exhaustivité ni son actualité et, à ce titre, l'ACIA publie le présent document sans aucune garantie que ce soit, expresse ou implicite. **Les lecteurs doivent en tout temps vérifier les renseignements** avant de s'en servir et devraient toujours, pour l'interprétation et l'application de la loi, **consulter les versions officielles** des lois, des lignes directrices et des règlements pertinents.*

## 5.0.) Décisions réglementaires

Un certain nombre de documents de décisions réglementaires sont disponibles qui présentent une analyse des données et la façon dont une décision d'évaluation a été prise. Les documents de décisions portent sur un certain nombre d'espèces végétales différentes qui représentent un large éventail de VCN. On peut les trouver à l'adresse :

- <http://www.inspection.gc.ca/francais/plaveg/pbo/ddf.shtml>

Santé Canada évalue l'innocuité alimentaire des aliments nouveaux ou des aliments produits à partir de VCN. Pour prendre connaissance de ces évaluations de sécurité et accéder à des exemples de décisions représentatives, se rendre à l'adresse suivante :

- [http://www.hc-sc.gc.ca/francais/protection/novel\\_foods.html](http://www.hc-sc.gc.ca/francais/protection/novel_foods.html)

D'autres décisions réglementaires influent sur la culture de certains VCN, particulièrement sur les stratégies de gestion de la résistance aux insectes pour les cultures qui sont résistantes aux insectes. On peut trouver de l'information sur ces stratégies pour le maïs Bt à l'adresse :

- <http://www.inspection.gc.ca/francais/plaveg/bio/bt/btcormai1f.shtml>

Pour consulter le document de décision pour le maïs Bt MON 810, se rendre à l'adresse :

- <http://www.inspection.gc.ca/francais/plaveg/bio/dd/dd9719f.shtml>

## Annexe A : Cultures vivrières

### Le maïs et ses utilisations

*Zea mays* L. (maïs) est cultivé depuis plus de 8 000 ans au Mexique et en Amérique centrale. Espèce versatile et adaptative, le maïs a crû autant en productivité qu'en distribution géographique au cours du siècle dernier, avec la mise au point d'hybrides, de programmes d'amélioration génétique et l'utilisation des engrais. Il est aujourd'hui cultivé sur tous les continents habitables. Les rendements du maïs avant l'hybridation des années 1930 étaient d'environ 1,3 tonne métrique par hectare (ha). Le record actuel est de 123,5 t/ha (avec une moyenne d'environ 137 boisseaux à l'acre aux États-Unis). La production mondiale de maïs en l'an 2000 était estimée à 23 800 millions de boisseaux.

Le maïs a plusieurs usages. Il est utilisé comme aliment de base dans de nombreuses parties du monde. Sous ses formes dérivées, il est utilisé pour fabriquer des produits comme l'amidon, l'alcool et l'huile. Il sert également à l'alimentation du bétail et à la production d'éthanol (combustible renouvelable).

La plante hôte utilisée est une lignée hybride de *Zea mays* qui descend du Mo17X (Hill X B73). Ces lignées de maïs ont de longs antécédents d'utilisation, en particulier pour l'alimentation du bétail, étant donné qu'il s'agit de maïs cultivé et non de maïs doux. Pour des précisions, voir le cahier parallèle de la Directive de réglementation Dir94-11 : *La biologie de Zea mays* L. (Maïs), à l'adresse :

- <http://www.inspection.gc.ca/francais/plaveg/bio/dir/dir9411f.shtml>

La variété résistante aux insectes (protégée) ou variété de maïs Bt MON 810 renferme un fragment génétique inséré du gène CryIA(b) provenant du *Bacillus thuringiensis* sous-souche kurstaki HD-1 qui produit une protéine endotoxine delta active exprimée dans le tissu du maïs.

L'entreprise décrit plus précisément la variété et son histoire « La lignée MON 810 a été fournie à diverses entreprises de semence en tant que semence F1 de génotype transformé Hi-II, croisée avec diverses lignées élites autofécondées. Les lignées résultantes ont été soumises à des cycles multiples de rétrocroisement avec la lignée souche autofécondée récurrente pour récupérer le génotype élite converti, suivis de plusieurs cycles de conjugaison intracellulaire pour dériver des lignées parentes autofécondées converties pour des tests sur les hybrides. D'autres cycles de multiplication des semences (conjugaison intracellulaire) sont requis pour produire des semences parentales pour la production de semences hybrides commerciales. Les semences hybrides protégées contre les insectes seront hétérozygotes pour le gène CryIA(b), étant donné qu'une lignée parente autofécondée qui renferme le gène suffit à conférer le phénotype protégé contre les insectes aux hybrides de descendance ».

La variété MON810 est un maïs cultivé, et non un maïs doux, et même s'il est destiné essentiellement à l'alimentation du bétail, il est parfois utilisé pour l'alimentation des humains. Par exemple, le MON 810 peut être utilisé après extraction par voie sèche ou humide dans des produits de maïs transformé pour les humains. Aucune nouvelle utilisation du MON 810 n'est prévue. Il sera utilisé de la même façon que les hybrides de maïs cultivé existants.

## Annexe B : Familiarisation avec les caractères nouveaux

### ***Bacillus thuringiensis* (Bt) et son histoire**

Le gène CryIA(b) inséré dans le MON810 provient d'une variante *kurstaki* du *Bacillus thuringiensis*. Le *Bacillus thuringiensis* (ou Bt) est une bactérie à Gram positif sporulée qui produit un cristal ayant des propriétés insecticides et qui est utilisée commercialement comme agent de lutte contre les ravageurs depuis des décennies.

Différentes souches de Bt ont une activité insecticide contre des insectes nuisibles choisis :

- les souches de *Bt Israelensis* pour les diptères (moustiques et simuliidés);
- les souches *Bt San Diego* et *tenebrionis* pour les coléoptères (doryphore de la pomme de terre, galéruque de l'orme, ténébrion meunier);
- les souches *Bt kurstaki*, *thuringiensis*, *sotto* et *aizawai* pour les lépidoptères (pyrale du maïs, sphinx de la tomate, spongieuse, arpenreuse du chou, noctuelle verdoyante, ver de la capsule du coton).

Dans le Bt, les protéines cristallines endotoxines delta sont produites lorsque le bacterium entre en phase de sporulation. Pour être actif, l'insecte doit ingérer la protéine. Même si celle-ci est insoluble à des pH neutres ou acides, elle est soluble au pH alcalin caractéristique du tube digestif des insectes larvaires, où elle est activée par les protéases dans le tube. La protéine activée (débarrassée de son résidu COOH-terminal, environ 28 acides aminés du N-terminal, à une taille d'environ 600 acides aminés) se diffuse à travers la membrane péritrophique de l'insecte dans l'épithélium de l'intestin moyen. De là, il se lie à des récepteurs spécifiques de haute affinité à la surface de l'intestin moyen de l'insecte, s'insère dans la membrane et forme des pores à ion spécifique. Les insectes, oiseaux, mammifères et poissons non visés ne possèdent pas ces récepteurs spécifiques. Les pores ainsi formés dans la membrane provoquent un écoulement du contenu intracellulaire dans la lumière de l'intestin moyen et d'eau dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen, ce qui provoque un gonflement et une lyse. L'intestin moyen devient paralysé, ce qui perturbe le processus digestif, entraîne l'arrêt de l'alimentation et cause la mort de l'insecte.

La protéine produite dans le maïs résistant aux insectes (IP) est identique à celle qui est produite par la souche de HD-1 *Bt kurstaki*, qui contrôle les insectes nuisibles en produisant des protéines cristallines delta endotoxines. Les données qui appuient cette allégation sont fournies dans la présentation.

Le donneur du gène CryIA(b) qui code la protéine CryIA(b), une protéine delta endotoxine active contre les lépidoptères nuisibles, est la sous-souche *kurstaki* (B.t.k) du *Bacillus thuringiensis*, souche HD-1.

Le B.t.k. est utilisé comme agent microbien de lutte contre les ravageurs depuis des décennies et « les protéines Bt qui sont produites naturellement ont fait la preuve qu'elles étaient pratiquement non toxiques pour les poissons, les espèces aviaires, les mammifères et d'autres espèces non visées... aucun effet nuisible n'est prévu sur la faune et la flore du fait de la commercialisation de ces végétaux. »

La présentation de l'entreprise précise : « la protéine CryIA(b) n'est insecticide que pour les lépidoptères. Seuls 7 des 18 insectes vérifiés étaient sensibles... et il s'agissait dans tous les cas de lépidoptères. Cette spécificité est directement imputable à la présence de récepteurs dans les insectes visés. L'activité sélective de l'endotoxine B.t.k. ne perturbera pas les populations d'insectes bénéfiques ou d'animaux non visés (p. ex., oiseaux, poissons). »

Les essais (cités dans la documentation), la documentation d'homologation et les évaluations de l'innocuité reliées à l'homologation des propriétés pesticides de produits pesticides microbiens disponibles sur le marché, comme DIPEL®, indiquent qu'ils sont « largement reconnus comme non toxiques pour les mammifères, les oiseaux et les poissons, ainsi que pour les insectes non visés bénéfiques, ce qui inclut les prédateurs et les parasites des lépidoptères et des abeilles domestiques. »

### **Ravageurs visés**

La pyrale du maïs (ECB) (*Ostrinia nubilalis*) est un insecte ravageur du maïs important. Les dommages physiques causés par l'ECB dépendent du nombre de générations et englobent une diversité d'effets, , notamment a) le broutage des feuilles b) le minage des tiges c) le broutage de la gaine foliaire et du collet et d) le dommage aux épis. On estime que les pertes dues à l'ECB vont de 5 à 10 % de la production annuelle de maïs, en raison de la perturbation de la translocation des éléments nutritifs et de l'eau, des infections secondaires, de la pourriture des tiges, de la chute des épis et des dommages aux grains.

## Annexe C : Constructions génétiques

Deux plasmides ont été utilisés dans le processus de transformation biolistique, PV-ZMBK07 (figure 1) qui renferme le gène CryIA(b) et PV-ZMGT10 (figure 2) qui renferme deux gènes marqueurs utilisés pour la sélection au glyphosate, CP4 EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase) et glyphosate oxidoreductase (gox). Les tableaux 1 et 2 décrivent les éléments d'ADN des plasmides. Le tableau 3 présente les combinaisons possibles de gènes et de produits nouveaux, étant donné le contenu des plasmides utilisés pour la transformation.

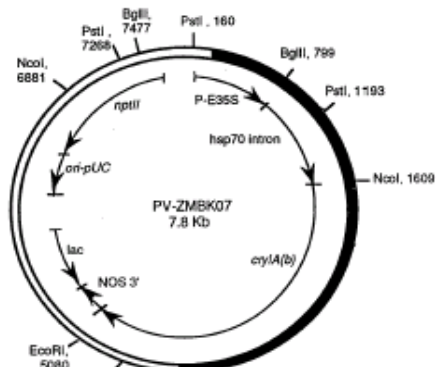


Figure 1. Carte des plasmides du PV-ZMBK07 qui indique les restrictions quant aux lieux d'essai. N'est pas à l'échelle.

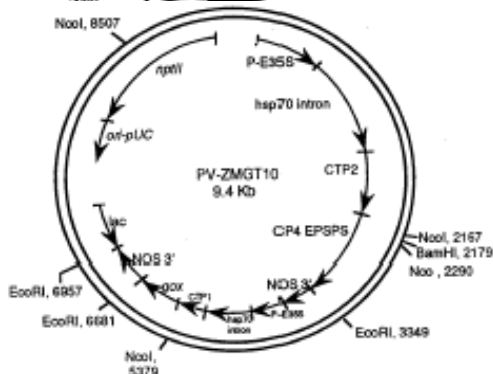


Figure 2. Carte des plasmides du PV-ZMGT10 qui indique les restrictions quant aux lieux d'essai. N'est pas à l'échelle.

Seule une portion du vecteur plasmidique PV-ZMBK07 est présente dans le MON 810 et la construction MON 810 finale ne renferme pas les gènes de sélection de la résistance au glyphosate. Les détails de la façon dont ceci a été déterminé suivent dans des sections ultérieures. « On présume que les gènes qui permettent la sélection au glyphosate ont été incorporés à l'origine à l'ADN génomique de la plante, mais qu'ils ont été perdus par séparation durant le rétrocroisement. » Le motif invoqué est que ces gènes « se sont intégrés à un loci distinct du gène CryIA(b) et se sont séparés durant le croisement ».

Les deux plasmides renfermaient le gène nptII qui code la néomycine phosphotransferase II (nptII) sous le contrôle de son propre promoteur bactérien, mais



le gène nptII s'est également avéré non présent dans le MON810. Ce gène bactérien a été utilisé comme marqueur de sélection durant la construction plasmidique.

Tableau 1 : Sommaire des éléments d'ADN dans le plasmide PV-ZMBK07

Élément génétique	Taille en Kb	Fonction
E35S	0,61	Le promoteur du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) avec la région activante dupliquée
hsp 70 intron	0,8	Intron du gène hsp70 du maïs (protéine de choc thermique) présent pour accroître le niveau de transcription génétique
CryIA(b)	3,46	Le gène code le produit protéique CryIA(b)
NOS 3'	0,26	Une région 3' non traduite de la nopaline synthase qui a pour fonction de terminer la transcription et de diriger la polyadénylation
lacZ	0,24	Une séquence codante lacI partielle de E coli, le promoteur Plac et une séquence codante partielle pour la $\beta$ -D-galactosidase
ori-pUC	0,65	ou protéine lacZ du pUC119 L'origine de la réplication pour les plasmides pUC qui permet la réplication plasmidique dans E. coli
nptII	0,79	Le gène de l'enzyme néomycine phosphotransférase de type II. Cette enzyme confère une résistance aux antibiotiques aminoglycosides, et permet ainsi la sélection de bactéries qui renferment le plasmide

Tableau 2 : Sommaire des éléments d'ADN dans le plasmide PV-ZMGT10

Élément génétique	Taille en Kb	Fonction
E35S	0,61	Le promoteur du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) avec la région activante dupliquée
hsp 70 intron	0,8	Intron du gène hsp70 du maïs (protéine de choc thermique) présent pour accroître le niveau de transcription génétique
CTP2	0,31	Le peptide de transit chloroplastique (CTP) isolé de Arabidopsis thaliana EPSPS présent pour diriger la protéine CP4 EPSPS vers le chloroplaste, le site de la synthèse des acides aminés aromatiques.

CP4 EPSPS	1,4	Le gène pour CP4 EPSPS, isolé de la souche CP4 de l'espèce <i>Agrobacterium</i> , qui permet la sélection de cellules transformées au glyphosate
CTP1	0,26	Le peptide de transit chloroplastique (CTP) isolé de la petite sous-unité du gène de ribulose-1,5-biphosphate carboxylase (SSU1A) à partir de <i>Arabidopsis thaliana</i> , présent pour diriger la protéine GOX vers le chloroplaste, le site de la synthèse des acides aminés aromatiques
gox	1,3	Le gène code le glyphosate qui métabolise l'enzyme glyphosate oxidoreductase (GOX) isolée de l'espace <i>Achromobacter</i> (nouveau gène <i>Ochrobactrum anthropi</i> ), souche LBAA
NOS 3'	0,26	Une région 3' non traduite de la nopaline synthase qui a pour fonction de terminer la transcription et de diriger la polyadénylation
lacZ	0,24	Une séquence codante lacI partielle de <i>E. coli</i> , le promoteur Plac et une séquence codante partielle pour la $\beta$ -D-galactosidase ou protéine lacZ du pUC119
ori-pUC	0,65	L'origine de la répllication pour les plasmides pUC qui permet la répllication plasmidique dans <i>E. coli</i>
nptII	0,79	Le gène de l'enzyme néomycine phosphotransférase de type II. Cette enzyme confère une résistance aux antibiotiques aminoglycosides, et permet ainsi la sélection de bactéries qui renferment le plasmide.

Les expériences sur la transformation du maïs ont démontré que la fréquence de l'obtention de transformants qui renferment la sélection de la tolérance au glyphosate a été accrue avec les deux marqueurs de sélection végétale, CP4 EPSPS et GOX. Ainsi, les deux marqueurs ont été utilisés.

La taille plasmidique du PV-ZMBK07 est de 7794 bp et celle du PV-ZMGT10 de 9427 bp.

Tableau 3 : Combinaison possible de gènes et de produits nouveaux compte tenu du contenu des plasmides

Gène nouveau	produit génétique nouveau	séquence réglementaire	autres séquences d'ADN
<b>PV-ZMBK07</b>			
<i>cryIA(b)</i>	Gène Bt	La séquence est contrôlée par le promoteur E35S (0,6 Kb) et un Intron 0,8 Kb du gène hsp70 (protéine de choc thermique) est présent pour accroître les niveaux de transcription génétique. Une séquence 3' de terminaison non traduite de la nopaline synthase de 0,24 Kb (NOS 3'), attachée au gène Cry fournit les signaux de polyadénylation du mRNA.	
<i>lacZ-alpha</i>	Betagalactosidase. Un lieu (région avec de multiples sites de clonage) qui a permis le clonage des gènes souhaités dans le vecteur plasmidique	Promoteur bactérien contrôlé. Liaison à la terminaison 3' du NOS	Suivi par une région de 0,7 Kb de répllication pour les plasmides pUC ( <i>ori</i> pUC), qui permet la répllication des plasmides dans <i>E. coli</i>
<i>NptII</i> (marqueur de sélection durant la construction du plasmide) provenant du transposon procaryote Tn5	Néomycine phosphotransférase  Résistance aux antibiotiques aminoglycosides (c.-à-d. kanamycine et néomycine)	Possède son propre promoteur bactérien	
<b>PV-ZMGT10</b>			
<i>gox</i> gène cloné de la souche LBAA de l'espèce <i>Achromobacter</i>	Enzyme de métabolisation du glyphosate, glyphosate oxidoreductase (GOX). Dégrade le glyphosate par conversion en acide aminométhylphosphonique et en glyoxylate	liaison avec le peptide CTP1 qui vise le gène aux plastes, un peptide de transit chloroplastique. Dérivé d'une sous-unité de ribulose gène -1,5 bisphosphate carboxylase (SSU1A) provenant de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Sous le contrôle des séquences, tel que décrit ci-dessus pour le promoteur E35S, intron hsp70 et terminaison 3' NOS	

## Annexe D : Expression

Des échantillons de maïs IP cultivé en plein champ (MON810) et un échantillon de contrôle (MON 818) prélevé dans des champs américains ont été utilisés pour évaluer le niveau d'expression de CryIA(b), CP4 EPSPS, GOX et des protéines NPTII. Les lignes de contrôle (MON 818 et 819) ne sont pas génétiquement modifiées, mais elles ont une génétique de référence représentative des substances d'essai. MON 818 est la contrepartie de MON810.

Des échantillons de feuille et de grain ont été prélevés en plein champ à six emplacements répartis à l'échelle des régions de culture de maïs aux États-Unis, et représentatives des conditions où le maïs IP peut être cultivé pour la production commerciale (2 en Illinois, 2 en Iowa, 1 en Indiana et 1 au Nebraska). Des échantillons de plants entiers et de pollen ont été prélevés une fois sur un site unique (en Illinois). Des échantillons de feuilles « saisonnières » (prélevés toutes les deux semaines) ont également été prélevés sur le site de l'Illinois. À l'exception des échantillons de pollen, les niveaux de protéine B.t.k. HD-1, CP4 EPSPS et GOX ont été évalués au moyen de techniques ELISA validées spécifiques à chaque protéine. Pour les échantillons de pollen, la technique ELISA a été utilisée pour les niveaux de B.t.k. et l'analyse de transfert de Western des protéines CP4 EPSPS et GOX.

Les niveaux d'expression du gène cryIA(b) étaient faibles dans les feuilles, les semences, le pollen et le tissu végétal de plants complets (tableau 4). Les protéines CP4 EPSPS, GOX et NPTII n'ont pas été détectées. L'expression moyenne des protéines évaluées aux six emplacements était de 9,35 µg/g de tissu frais (poids frais) dans les feuilles et de 0,31 µg/g (poids frais) dans les semences. L'expression des protéines évaluée à un emplacement était de 4,15 µg/g de tissus frais (poids frais) dans le plant entier et de 0,09 µg/g de tissus frais (poids frais) dans le pollen, selon les constatations d'un échantillon unique. L'expression des protéines variait de 7,93 à 10,34 µg/g de tissu frais (poids frais) dans les feuilles, de 0,19 à 0,39 µg/g de tissu frais (poids frais) dans les grains et de 3,65 à 4,65 µg/g de tissu frais (poids frais) dans le plant entier. L'expression des protéines déclinait au cours de la saison de culture, comme l'indiquent les niveaux de CryIA(b) présents dans les feuilles analysées au cours de la saison de culture.

Selon les déclarations de l'entreprise, la spécificité tissulaire n'était pas prévue, étant donné que le gène CryIA(b) est « sous le contrôle d'un promoteur CaMV. Étant donné qu'il s'agit d'un promoteur constitutif, aucune spécificité d'expression dans des tissus particuliers n'est prévue, même si le promoteur CaMV pourrait être plus ou moins actif dans certains types de cellules, comme le montre la distribution des protéines CryIA(b) dans les tissus. » La spécificité du stade de développement, pas plus que l'inductibilité n'ont pas non plus été attendus ou trouvés, étant donné que le promoteur CaMV est un promoteur constitutif non inductible.

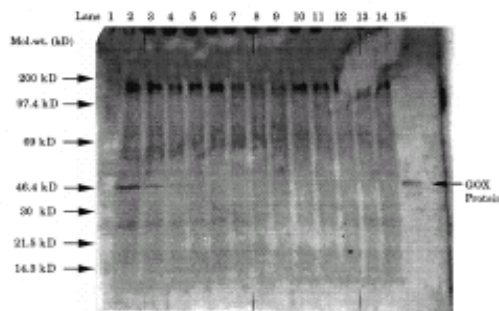
Tableau 4 : Sommaire des niveaux d'expression de protéines dans les tissus de MON810<sup>1</sup>

TISSU	MOYENNE	ÉCART TYPE	FOURCHETTE
<b>Btk HD-1</b>			
feuille	9,35	1,03	7,93-10,34
feuilles saisonnières <sup>2</sup>	9,78, 8,43, 4,91		
pollen	0,09		
plant entier <sup>3</sup>	4,15	0,71	3,65-4,65
grain	0,31	0,09	0,19-0,39
<b>CP4 EPSPS</b>			
feuille, feuilles saisonnières <sup>2</sup> , plant entier, grain	nd	-	-
<b>GOX</b>			
feuille, feuilles saisonnières <sup>2</sup> , plant entier, grain	nd	-	-

<sup>1</sup>Sauf mention contraire, les valeurs sont en µg/g de tissus frais (poids frais). Sauf mention contraire, la moyenne, l'écart type et la fourchette ont été échantillonnés sur les six sites. Pour les échantillons prélevés à un emplacement, voir autres notes.

<sup>2</sup>Les chiffres sont des moyennes pour les trois périodes distinctes de prélèvements effectués à intervalles de deux semaines.

<sup>3</sup>La moyenne et l'écart type ont été calculés à partir d'un site unique.



La méthode de transfert de Western du pollen (figure 3) indique que ni le gène CP4 EPSPS ni le gène GOX n'étaient exprimés dans MON810 (bandelette 11).

Figure 3. Analyse par transfert de Western de la protéine GOX dans le pollen. La bandelette 11 est le MON810.

Lane	1) Amersham Rainbow MWM RPN756 batch 43 lot 4
	2) 1.0 µg E.coli GOX M4-C1 lot 333-73001 spiked into MON 818
	3) 0.5 µg E.coli GOX M4-C1 lot 333-73001 spiked into MON 818
	4) 0.25 µg E.coli GOX M4-C1 lot 333-73001 spiked into MON 818
	5) 0.125 µg E.coli GOX M4-C1 lot 333-73001 spiked into MON 818
	6) MON 818 control extract
	7) MON 801 extract
	8) MON 802 extract
	9) MON 806 extract
	10) MON 809 extract
	11) MON 810 extract
	12) MON 813 extract
	13) MON 814 extract
	14) MON 818 control extract
	15) 0.5µg E.coli GOX M4-C1 lot 333-73001
	Limit of detection (LOD): 0.125 µg GOX/0.287µg tissue fresh weight
	0.87 µg GOX/g tissue fresh weight

Pour les évaluations d'aliments nouveaux, l'expression dans la portion consommée du végétal, le grain est le plus important. Les niveaux d'expression dans le grain de la protéine nouvelle

varient de 0,19 à 0,39 µg/g de poids frais.

L'expression de la protéine NPTII du gène nptII, sous contrôle d'un promoteur bactérien spécifique, a été vérifiée pour l'une des lignées utilisées pour ce test (MON 801). Le promoteur n'était pas actif et, donc, le gène n'exprime pas la protéine dans les cellules végétales.

## **Annexe E : Processus de transformation**

L'ADN plasmidique a été introduit dans le tissu végétal par accélération de particules, ou des méthodes biolistiques. L'ADN est précipité à la surface de particules microscopiques de tungstène ou d'or, en utilisant le chlorure de calcium et la spermidine. Une goutte de particules enduites, déposée sur un macrosupport en plastique, est accélérée à haute vitesse à travers un cylindre par une explosion de poudre. Le vol du macrosupport est stoppé par une plaque d'arrêt du plastique, ce qui permet aux particules enduites d'ADN de poursuivre leur trajet et de pénétrer les cellules végétales dans le trajectoire de l'explosion. L'ADN est déposé sur le chromosome de cellule et s'y incorpore. Les cellules sont incubées sur un milieu de culture tissulaire qui renferme du 2,4-D, qui favorise la croissance de cal. Les cellules avec ADN introduit renferment des gènes pour la tolérance au glyphosate et elles sont cultivées en présence du glyphosate pour sélectionner les cellules transformées.

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour déterminer la caractérisation moléculaire, notamment les analyses par transfert de Southern et de Western. Les tableaux 1 à 3, qui décrivent les composantes d'ADN montrent l'insertion possible du matériel en fonction des combinaisons plasmidiques possibles du matériel génétique. Toutefois, les données indiquent que cela n'a pas été le cas.

## Annexe F : Caractérisation moléculaire

La caractérisation moléculaire de l'ADN intégré (I-DNA) incluait la détermination des éléments suivants :

- le nombre d'inserts (nombre de sites d'intégration au sein du génome du maïs);
- le nombre de copies (nombre de chaque gène au sein de l'ADN intégré);
- l'intégrité des inserts.

La méthode de transfert de Southern a été utilisée pour déterminer les paramètres ci-dessus.

MON810 est comparé à une lignée de contrôle (contrepartie) MON 818, qui possède également un Mo17 X (Hi-II X B73) résiduel. MON 818 ne renferme pas les gènes codant les protéines B.t.k. HD-1, CP4 EPSPS ou GOX.

### Nombre d'inserts

Après digestion de l'ADN extrait avec l'enzyme de restriction *NdeI*, qui ne s'encode dans aucun des plasmides utilisés pour produire MON810, l'analyse indique qu'une bande unique d'environ 5,5 Kb a été observée (figures 3, 4 et 5). Cela indique que l'ADN des plasmides était présent à un emplacement. Cela est justifié par le fait qu'en l'absence de sites de restriction à l'intérieur des plasmides, l'enzyme s'encode à l'extérieur de l'ADN inséré et le fragment renfermera l'ADN inséré et certains ADN génomiques adjacents. Les autres bandes dans les bandelettes de contrôle et des échantillons sont considérées comme résiduelles (identifiées par des astérisques).

### Composition des inserts

La digestion avec une diversité d'enzymes de restriction (isolément ou en combinaison) suivie par l'hybridation avec les plasmides PV-ZMBK07 et PV-ZMGT10 est utilisée pour évaluer la composition génétique globale du I-DNA (figures 3 et 4, tableau 5)

Tableau 5 : Digestion des enzymes de restriction et résultats des sondes

Combinaison d'enzymes	Bande-lettes (Kb)	Hybridation avec		INTERPRÉTATION
		PV-ZMBK07	PV-ZMGT10	
<i>NcoI</i> avec <i>EcoRI</i>	8,0 2,8	88	8	Le fragment de 2,8 Kb renferme le gène <i>cryIA(b)</i> qui n'est pas présent dans PV-ZMGT10
<i>NcoI</i> avec <i>BglII</i>	5,0 3,0 0,81	8 8 8	88	Le fragment de 3,0 Kb est attribué au gène <i>CryIA(b)</i> . La bandelette de 5,0 Kb est faible en raison de la faible quantité d'ADN complémentaire dans le fragment de bordure
<i>PstI</i>	taille deux 3,1	8	8	

<i>Pst</i> I avec <i>Nde</i> I	3,1 0,8	8 8	8 8	La taille de l'un des fragments de 3,1 a été réduite. Cela signifie que le site <i>Nde</i> I le plus proche de la région E35S est plus proche de l'I-DNA que du site <i>Pst</i> I.
<i>Nco</i> I avec <i>Bam</i> HI	aucun	Le gel de contrôle dopé était un mélange des deux plasmides.		Le contrôle dopé avait une bandelette de 3,1 Kb, la taille prévue du fragment CP4 EPSPS provenant de PV- ZMGT10

En utilisant un certain nombre de sondes, les essais indiquent que les séquences de CP4 EPSPS, *gox* et *ori-pUC* n'ont pas été détectées dans MON810, alors que *nptII*, E35S, *hsp70* et le *CryIA(b)* étaient présents.

### Hybridation avec la sonde *CryIA(b)*

Lorsque l'intégralité du gène *CryIA(b)* apparaît dans MON810, alors un fragment de 3,5 Kb devrait être détecté à la digestion avec *Nco*I et *Eco*RI. Toutefois on trouve un fragment de 2,8 Kb (figure 4, bandelette 10). Cela signifie qu'un des sites d'enzyme de restriction, voire les deux, manque dans le gène.

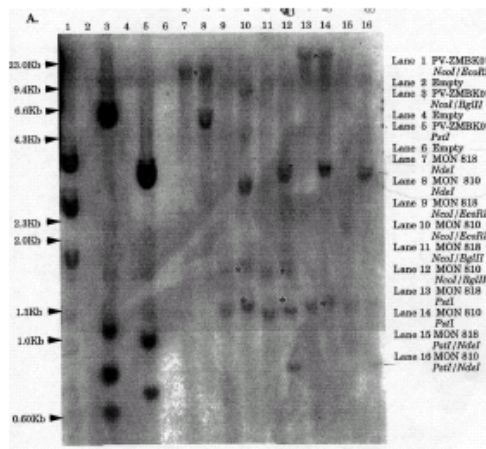


Figure 4. Technique par transfert de Southern appliquée à l'ADN digéré avec une diversité de combinaisons d'enzymes de restriction et sondé avec le plasmide PV-ZMBK07. Les bandelettes 8, 10, 12, 14 et 16 sont l'ADN du MON810 digéré avec respectivement *Nde*I, *Nco*I/*Eco*RI, *Eco*I/*Bgl*II, *Pst*I et *Pst*I/*Nde*I. Les astérisques indiquent une hybridation résiduelle.

La sonde pour la région *hsp70* indique que le site *Nco*I est intact; cela signifie donc que le site *Eco*RI n'est pas présent à la terminaison 3' du gène. De plus, le gène *CryIA(b)* s'est hybridé avec le fragment de 3,0 Kb dans la digestion avec *Nco*I/*Bgl*II et les fragments de 3,1 Kb provenant de la digestion avec *Pst*I, ce qui signifie que ces fragments ont une activité *Cry*. Voir figures 4 et 5.

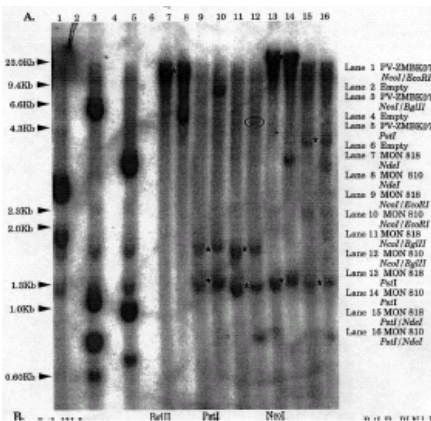


Figure 5. Technique par transfert de Southern appliquée à l'ADN digéré avec une diversité de combinaisons d'enzymes de restriction et sondé avec le plasmide PV-ZMGT10. Les bandelettes 8, 10, 12, 14 et 16 sont l'ADN du MON810 digéré avec respectivement *Nde*I, *Nco*I/*Eco*RI, *Eco*I/*Bgl*II, *Pst*I et *Pst*I/*Nde*I. Les astérisques indiquent une hybridation résiduelle.



La digestion de l'ADN avec *NcoI/EcoRI* pour la dissémination du gène *CryIA(b)* suivie par une analyse par transfert de Southern a permis de constater un fragment d'environ 3,1 Kb (figure 6), qui est « suffisant pour coder une protéine *CryIA(b)* ayant des propriétés insecticides actives ». Alors que « le contrôle d'hybridation positif (bandelette 1 de la figure 6) a produit un fragment de 3,46 Kb, qui correspond à la taille prévue du gène *CryIA(b)*, l'ADN du MON 818 DNA (bandelette 2) ne renferme pas de bandes, comme on le prévoyait pour la lignée de contrôle. L'ADN de MON810 renferme une bande d'environ 31,1 Kb. »

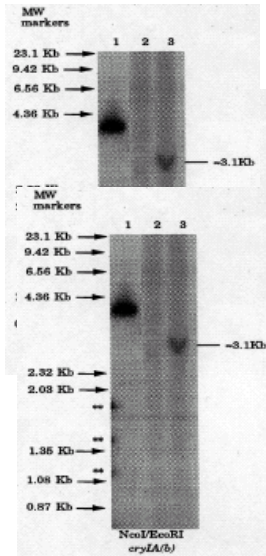


Figure 6. Technique par transfert de Southern appliquée à l'ADN digéré avec *NcoI/EcoRI* et sondé au moyen du gène *CryIA(b)*.

Bandelette 1 : plasmide PV-ZMBK07  
 Bandelette 2 : ADN du MON 818  
 Bandelette 3 : ADN du MON810

### Hybridation avec la sonde E35S

L'ADN a été digéré avec *PstI* seul et en combinaison avec *NdeI*. Lorsque la région renfermant *hsp70* et l'ensemble de la région E35S étaient présentes dans MON810, il se produisait alors un fragment de 1,0 Kb lors de la digestion avec *PstI*, mais on a trouvé deux fragments de 3,1 Kb. Lorsque le *PstI* a été combiné avec la digestion au moyen de *NdeI*, un des fragments de 3,1 Kb s'est réduit à 0,9 Kb (figure 7). La sonde E35S a également hybridé avec le fragment de 8,0 Kb de la digestion avec *NcoI/EcoRI*, et le fragment de 5,0 Kb de la digestion avec *NcoI/BglII*.

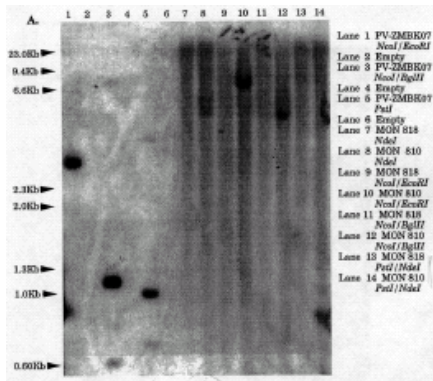


Figure 7. Technique par transfert de Southern appliquée à l'ADN digéré avec une diversité de combinaisons d'enzymes de restriction et sondé avec le plasmide E35S. Les bandelettes 8, 10, 12 et 14 sont l'ADN du MON810 digéré avec respectivement *NdeI*, *NcoI/EcoRI*, *EcoI/BglII*, *PstI* et *PstI/NdeI*. Les bandelettes 7, 9 11 et 13 sont pour le MON 818, avec les mêmes enzymes.

## Hybridation avec la sonde hsp70

Si l'ensemble de l'intron hsp70 existe dans le MON810, la digestion avec *NcoI* et *BglII* produirait un fragment de 0,81 Kb. La détection d'une bande de 0,8 Kb signifie que tant le site de *NcoI* que celui de *BglII* étaient présents et intacts, et prouvent la présence d'un hsp70 intact. D'autres preuves qui étayent la présence d'un hsp70 entier (figure 8) incluent le fait qu'il y a également hybridation de la sonde avec le fragment de 8,0 Kb dans la digestion avec *NcoI/EcoRI*, avec le fragment de 3,1 Kb dans la digestion avec *PstI* et avec les fragments 3,1 Kb et 0,8 Kb dans la digestion avec *PstI/NdeI*.

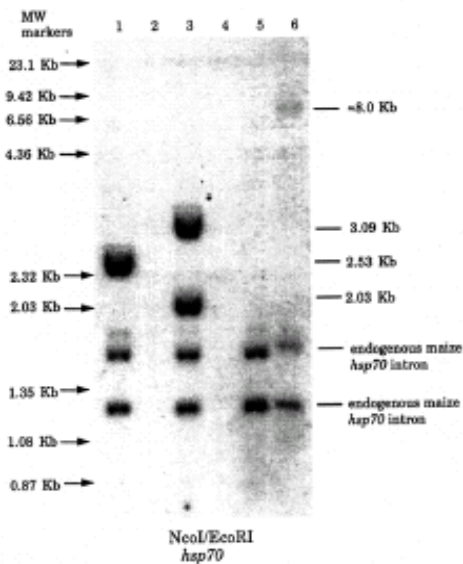
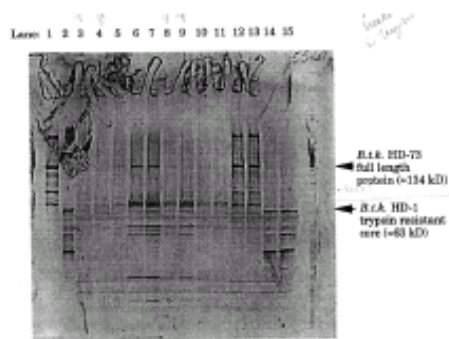


Figure 8. Technique par transfert de Southern appliquée à l'ADN digéré avec *NcoI/EcoRI* et sondé avec hsp70. Bandelette 1-MON 818 avec PV-ZMBK07. Bandelette 3 - MON 818 avec PV-ZMGT10. Bandelette 5 - ADN MON 818; bandelette 6 - ADN MON810. Les autres bandelettes sont vierges.

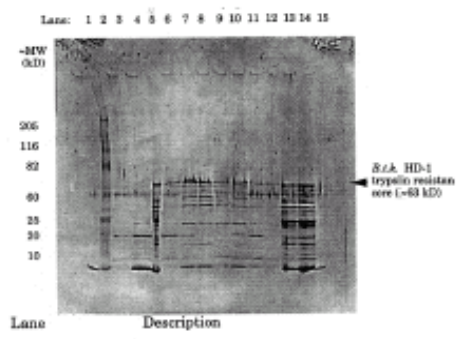
Pour approfondir l'analyse de la composition de l'insert, un clone génomique renfermant la région 3' a été isolé et caractérisé. Le séquençage du clone a prouvé que le site *EcoRI* n'était pas présent et précisé le point terminal de l'intégration. L'analyse de la séquence indique que l'ADN s'achève à la position 2448 bp et qu'un cadre ouvert de lecture maximum de 2 454 nucléotides est présent, l'insert

commençant au nucléotide 1 du gène. Ce cadre code une protéine qui renferme le 1-816 de la protéine *Btk* HD-1, plus deux acides aminés supplémentaires suivis d'un cordon d'arrêt.

La technique par transfert de Western indique que la protéine résistant à la tryptine de 63 Kb est produite par le gène *CryIA(b)* partiel intégré dans le MON810 (figures 9 et 10). « À partir des données de la technique par transfert de Western et compte tenu de l'efficacité de la lignée de maïs MON810, le gène *CryIA(b)* présent produit une protéine *CryIA(b)* insecticide, qui assure un contrôle efficace et à longueur de saison de l'ECB.»



Lane	Description
1	<i>E. coli</i> -produced B.t.k. HD-78 full length protein, 20 ng loaded
2	<i>E. coli</i> -produced B.t.k. HD-1 trypsin-resistant core, 20 ng loaded
3	MON 818 leaf protein extract, 25 µg loaded
4	MON 819 leaf protein extract, 24 µg loaded
5	MON 801 leaf protein extract, 29 µg loaded
6	MON 802 leaf protein extract, 26 µg loaded
7	MON 805 leaf protein extract, 26 µg loaded
8	MON 809 leaf protein extract, 26 µg loaded
9	MON 810 leaf protein extract, 26 µg loaded
10	MON 813 leaf protein extract, 27 µg loaded
11	MON 814 leaf protein extract, 29 µg loaded
12	<i>E. coli</i> -produced B.t.k. HD-78 full length protein, 20 ng spiked into 19 µg of MON 818 leaf protein extract
13	<i>E. coli</i> -produced B.t.k. HD-78 full length protein, 20 ng spiked into 16 µg of MON 819 leaf protein extract
14	<i>E. coli</i> -produced B.t.k. HD-1 trypsin-resistant core, 20 ng, spiked into 19 µg of MON 818 leaf protein extract
15	<i>E. coli</i> -produced B.t.k. HD-1 trypsin-resistant core, 20 ng, spiked into 16 µg of MON 819 leaf protein extract



Lane	Description
1	Blank lane, 1X SeprenSol
2	Color molecular weight markers from Sigma
3	MON 818 leaf protein extract, trypsinized
4	MON 819 leaf protein extract, trypsinized
5	<i>E. coli</i> -produced B.t.k. HD-1 trypsin-resistant core protein standard, 20 ng
6	MON 801 leaf protein extract, trypsinized
7	MON 802 leaf protein extract, trypsinized
8	MON 805 leaf protein extract, trypsinized
9	MON 809 leaf protein extract, trypsinized
10	MON 810 leaf protein extract, trypsinized
11	MON 813 leaf protein extract, trypsinized
12	MON 814 leaf protein extract, trypsinized
13	<i>E. coli</i> -produced B.t.k. HD-1 trypsin-resistant core protein standard, 20 ng, spiked into MON 818 extract
14	<i>E. coli</i> -produced B.t.k. HD-1 trypsin-resistant core protein standard, 20 ng, spiked into MON 819 extract
15	Blank lane, 1X SeprenSol

\*Protein load not determined for the corn extracts  
 •7.5 µl of each corn extract was loaded in 15 µl total volume (lanes 3-4, 6-12)  
 •When spiked with standards (lanes 13-14), 5 µl of the control corn line extracts (MON 818 and MON 819) were loaded in 10 µl total volume

Figure 9 (gauche). Données de la méthode de Western sur les protéines *Btk*HD-1 dans les tissus du maïs. Le MON810 figure dans la bandelette 9.

Figure 10 (droite). Données de la méthode de Western sur les protéines BTKHD-1 trypsinisées dans les extraits de tissu de maïs. Le MON810 se situe dans la bandelette 9.

La digestion avec le *NcoI/BamHI* disséminerait n'importe lequel des gènes CP4 EPSPS présents. La méthode de Southern (figure 11) indique que le MON810 ne renferme pas le fragment de 3,1 Kb (taille prévue du CP4 EPSPS) trouvé dans le gel dopé au moyen des deux plasmides. La protéine CP4 EPSPS n'a pas été détectée par la technique ELISA dans le tissu des feuilles, du plan entier ou des grains. La méthode de transfert de Western confirme l'absence de protéines dans les extraits de feuilles (figure 12, bandelette 9).

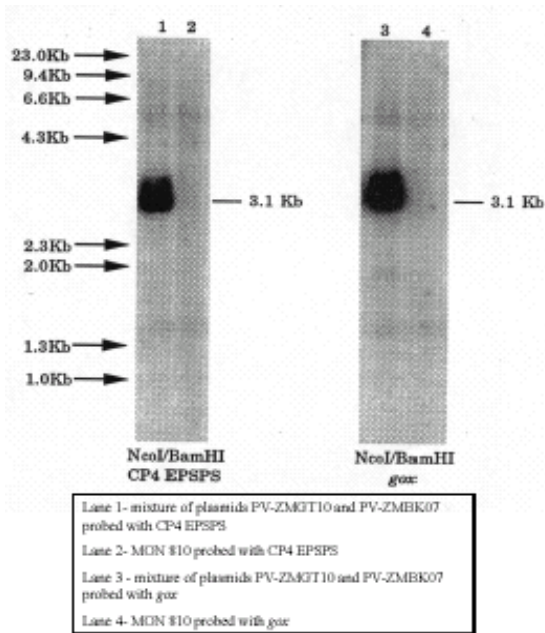


Figure 11. Données de la technique de Southern appliquée à l'ADN digéré avec *NcoI/BamHI* et sondé avec CP4 EPSPS (gauche) et les gènes *gox* (droite).

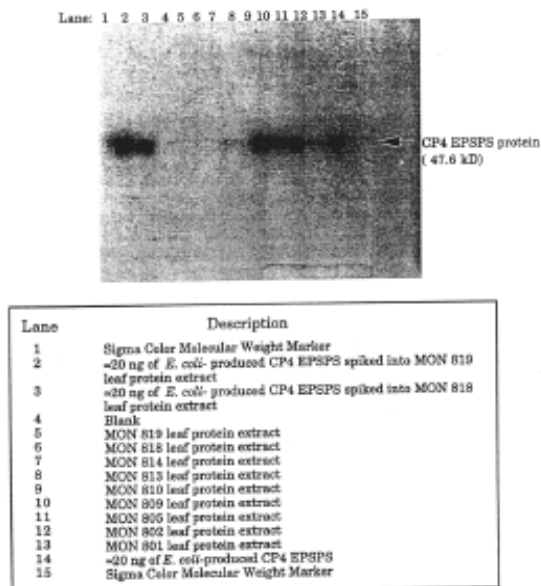


Figure 12. Données de la technique de Western appliquée à la protéine CP4 EPSPS dans le tissu du maïs. Le MON810 se situe à la bandelette 9.

## Intégrité du gène *Gox*

La digestion au moyen de *NcoI/BamHI* exciserait le gène *gox*, s'il est présent (*NcoI* à *NcoI*) et il aurait une taille d'environ 3,1 Kb. La méthode de transfert de Southern (figure 11) indique que le MON 810 ne renferme pas de gène *gox*. Il n'a pas non plus été détecté par la technique ELISA appliquée aux tissus végétaux, pas plus que par la méthode de transfert de Western (figure 13, bandelette 8).

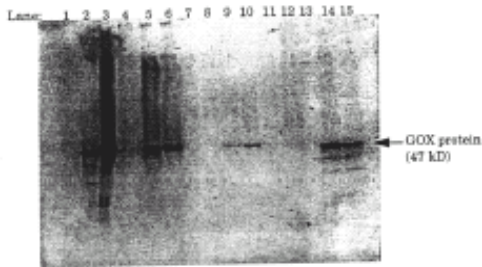


Figure 13. Analyse par transfert de Western de la protéine GOX dans le tissu du maïs. Le MON810 se situe à la bandelette 8.

Lane	Description
1	Sigma Cedar Molecular Weight Marker
2	<i>E. coli</i> -produced GOX protein, ~20 ng
3	Isolated GOX protein from corn line 423-06-01
4	MON 803 leaf protein extract
5	MON 805 leaf protein extract
6	MON 806 leaf protein extract
7	MON 810 leaf protein extract
8	MON 810 leaf protein extract
9	MON 813 leaf protein extract
10	MON 814 leaf protein extract
11	MON 818 leaf protein extract
12	MON 819 leaf protein extract
13	Blank
14	<i>E. coli</i> -produced GOX protein, ~20 ng, spiked into MON 818 leaf protein extract
15	<i>E. coli</i> -produced GOX protein, ~20 ng, spiked into MON 819 leaf protein extract

### Intégrité du squelette

L'ADN (*nptII/ori-pUC*) du squelette sera détecté après digestion au moyen de *NcoI/EcoRI*, avec les bandes de 2,5 Kb et 1,8 Kb de taille, lorsque sondé au moyen du plasmide PV-ZMBK07 et la bande de 1,8 Kb pour les deux plasmides (*ori-pUC*). La méthode de Southern (figure 14) indique que le MON810 ne contient aucune séquence du squelette. Le plasmide ZMGT10 produit deux bandes de 1,5 Kb et 3,0 Kb de taille, les fragments de squelette du plasmide prévus.

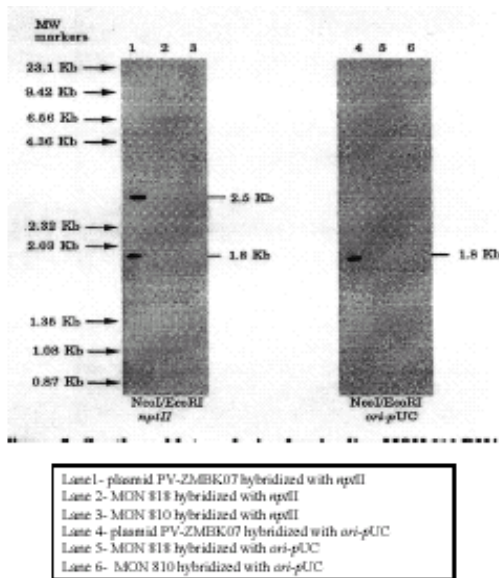


Figure 14. Méthode par transfert de Southern de l'ADN digéré avec *NcoI/EcoRI* et hybridé avec les séquences du squelette, *nptII* (gauche) et *ori-pUC* (droite).

Les données de la méthode de Southern sondées avec *hsp70* indiquent que le MON810 renferme deux bandes *hsp70* endogènes (1,2 et 1,5 Kb) et une bande de 8,0 Kb qui contient l'intron associé au gène *CryIA(b)* (figure 8). Cela démontre une copie unique du gène. Étant donné que l'ADN sondé avec *nptII/ori-pUC* n'a produit aucune bande, cela démontre l'absence de séquence du squelette.

L'interprétation de l'information qui précède est que un I-DNA qui contient environ 4 Kb de l'ADN du plasmide PV-ZMBK07, consistant en une portion du promoteur amélioré E35S (qu'on estime inclure l'un des deux éléments activateurs plus le promoteur), l'intégralité de l'intron provenant du gène *hsp70* (protéine de choc thermique) et 2 448 bp de la longueur totale du gène *CryIA(b)* 3 468 bp, a été inséré dans le génome du MON810, comme l'indique le schéma de la figure 15. Aucun ADN du squelette du vecteur bactérien (p. ex., l'origine pUC de la répllication), des gènes *nptII*, *gox* ou CP4EPSPS, n'a été détecté. Selon la présentation, « le MON 810 renferme un ADN intégré contenu sur un fragment *NdeI* de 5,5 Kb, qui renferme le promoteur E35S, l'intron *hsp70* du maïs et le gène *cryIA(b)* ». La méthode de Western a montré que la protéine *B.t.k.* HD-1 63 kD résistante à la trypsine a été produite dans le MON810.

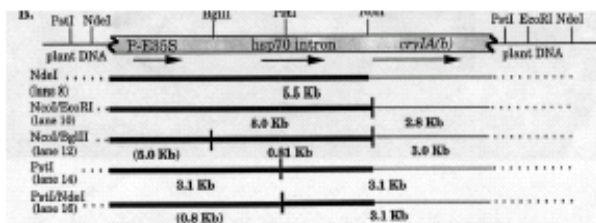


Figure 15. Schéma de l'ADN inséré provenant de la méthode de transfert. Pas à l'échelle.

L'ADN plasmidique est introduit dans le tissu végétal par accélération de particules ou méthode biolistique. L'ADN est précipité à la surface de particules microscopiques de tungstène ou d'or, en utilisant le chlorure de calcium et la spermidine. Une goutte de particules enduites, déposée sur un macrosupport en plastique, est accélérée à haute vitesse à travers un cylindre par une explosion de poudre. Le vol du macrosupport est stoppé par une plaque d'arrêt du plastique, ce qui permet aux particules enduites d'ADN

de poursuivre leur trajet et de pénétrer les cellules végétales dans le trajectoire de l'explosion. L'ADN est déposé sur le chromosome des cellules et s'y incorpore. Les cellules sont incubées sur un milieu de culture tissulaire qui renferme du 2,4-D, qui favorise la croissance de cal. Les cellules avec ADN introduit renferment les gènes pour la tolérance au glyphosate et elles sont cultivées en présence du glyphosate pour sélectionner les cellules transformées.

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour déterminer la caractérisation moléculaire, notamment les techniques par transfert de Southern et de Western. Les tableaux 1 à 3, qui décrivent les composantes d'ADN, montrent l'insertion possible du matériel en fonction des combinaisons plasmidiques possibles du matériel génétique. Toutefois, les données indiquent que cela n'a pas été le cas.

## Annexe G : Intégrité des caractères

### Intégrité et activité du gène CryIA(b)

Durant le processus d'accélération des particules, l'ADN plasmide peut être brisé, avec pour résultat l'intégration de gènes partiels à l'ADN génomique. L'analyse de Southern et la séquence de clone génomique ont établi que les premiers 2 448 bp du gène CryIA(b) de 3 468 bp s'étaient intégrés au MON 810.

L'analyse moléculaire du MON 810 a « prouvé que la lignée ne renferme que le gène CryIA(b) du plasmide PV-ZMBK07 et non les gènes CP4 EPSPS, gox ou nptII/ori-pUC. Il n'existe aucune preuve que de l'ADN contenu dans le plasmide PV-ZMGT10 ait été inséré. Le MON 810 contient un fragment d'ADN intégré, contenu dans un fragment de NdeI de 5,5 Kb, qui contient le promoteur E35S, l'intron hsp70 du maïs et le gène CryIA(b). »

### Le gène CryIA(b) et ses caractères nouveaux

Le gène pleine longueur codant la protéine CryIA(b) a été décrit. Alors que les gènes insérés dans le MON 810 ont été modifiés pour améliorer l'expression dans le maïs, la séquence d'acides aminés de la protéine insérée est identique à celle de la protéine naturelle dérivée du B.t.k. Le fragment de gène CryIA(b) (tableau 6) inséré dans le MON 810 s'est avéré être équivalent à la source bactérienne originale, du point de vue de l'activité de contrôle des insectes nuisibles (voir ci-dessous).

Tableau 6 : Sommaire des produits géniques dans la plante modifiée

produit génique	produits de dégradation, dérivés et leurs voies métaboliques	expression	activité du produit génique dans la plante	activité du produit génique dans l'environnement
protéine endotoxine delta CryIA(b)	le peptide tryptique est un ingrédient actif	constitutif	n'affecte pas les autres voies métaboliques	dégradé rapidement par digestion et dans le sol

La méthode de Western a été utilisée pour :

- évaluer les produits protéiques du gène partiel en utilisant les anticorps spécifiques aux protéines *B.t.k.*;
- les comparer aux protéines types produits par *E. coli* et aux extraits tissulaires provenant d'autres lignées de maïs protégées contre les insectes;
- rechercher des produits protéiques anormaux;
- déterminer si la protéine *B.t.k.* exprimée a été transformée en un produit protéique résistant à la trypsine d'une taille prévue de 63 kD. Étant donné que les gènes CP4 EPSPS et gox n'étaient pas présents dans le MON 810, la méthode de Western n'a pas été appliquée à ces protéines (figures 9 et 10).



L'entreprise déclare : « Comme on l'observe couramment dans le cadre de la méthode de Western appliquée aux protéines B.t., des produits protéiques multiples ont été observés pour la lignée MON810 et les six autres lignées de maïs protégées contre les insectes (figure 9, bandelettes 5-11). Le gène de pleine longueur n'a pas été observé dans la lignée MON810 comme on le prévoyait, étant donné que le gène pleine longueur n'était pas incorporé au génome du maïs. ... le MON810 n'a montré aucune différence apparente dans les ordres de grandeur des tailles des produits protéiques qui n'avaient pas la pleine longueur... en comparaison des autres six lignées protégées contre les insectes, produites au moyen du même gène CryIA(b) pleine longueur. Le poids moléculaire prévu de la protéine HD-1 B.t.k. provenant du gène CryIA(b) partiel est de 92 kD, mais elle n'est pas détectée, vraisemblablement en raison du faible niveau d'expression ou de la dégradation rapide en un produit résistant à la trypsine durant le processus d'extraction. »

Lorsque les extraits protéiques ont été soumis à la digestion par la trypsine, les sept lignées affichaient une taille approximative de la protéine noyau de 63 kD (figure 10).

Les produits protéiques dans le MON 810 et les produits immunoréactifs prévus sont similaires à ceux des autres lignées de maïs IP, sauf l'absence de la protéine HD-1 B.t.k. pleine longueur. Aucun produit imprévu n'a été observé. Les résultats relatifs à la trypsine démontrent que le gène CryIA(b) partiel inséré dans le MON 810 produit la protéine HD-1 B.t.k. efficace en termes de résistance à la trypsine.

### **Équivalence des protéines bactériennes et des protéines produites par la plante**

De l'*Escherichia coli* renfermant le gène Btk a été utilisé pour produire les quantités de protéines CryIA(b) nécessaires pour les tests, notamment les essais relatifs à l'alimentation animale. On a donc évalué l'équivalence de la protéine HD-1 B.t.k. produite dans le maïs IP avec celle issue de *E. coli*. Comme le déclare l'entreprise, cela est justifié par le fait que « le niveau d'expression de la HD-1 B.t.k. dans les plans de maïs IP est extrêmement faible. Aussi, il n'est pas faisable d'isoler cette protéine des plans en quantités suffisantes pour réaliser les différentes études d'innocuité nécessaires pour l'homologation de ces produits. La meilleure option consistait à isoler cette protéine HD-1 B.t.k. produite dans un hôte microbien... et à vérifier son équivalence physique et fonctionnelle avec la protéine exprimée dans le végétal. Étant donné que la protéine HD-1 B.t.k. pleine longueur (~ 131 kD) serait censée être rapidement transformée en une protéine noyau résistante à la trypsine (~ 63 kD) après ingestion... le noyau résistant à la trypsine de la protéine HD-1 B.t.k. a été considéré comme du matériel de test adéquat pour évaluer la protéine HD-1 B.t.k. pleine longueur. »

Deux études ont été présentées. L'une compare le CryIA(b) HD-1 B.t.k. de DIPEL avec des échantillons de tissus foliaires du végétal exprimés dans la lignée 754-10-1. La lignée 754-10-1 a été produite au moyen des mêmes plasmides de transformation que le MON 810, mais elle possède un niveau d'expression plus élevé de la protéine et

donc, il a été possible de purifier une plus grande quantité de protéines pour les études d'équivalence. L'étude a fait la preuve que le noyau résistant à la trypsine de la HD-1 B.t.k. du maïs et de E. Coli sont équivalents en poids moléculaire et en spécificité immunologique, les deux contenant une bande de protéine B.t.k. H-D1 pleine longueur d'environ 334 kD et le même noyau résistant à la trypsine d'environ 63 kD. Les analyses de Western ont démontré que le noyau de la protéine HD-1 B.t.k. de la lignée 754-10-1 et celui du MON 810 étaient équivalents; aussi, on en conclut que la protéine produite par E. coli est un substitut adéquat de la protéine dans le MON 810.

On constate la présence de produits protéiques multiples dans l'extrait végétal, dans le produit microbien commercial DIPEL ainsi que dans la préparation protéique pleine longueur utilisée pour l'étude de toxicité aiguë. Les questions concernant d'autres fragments produits par la technique de Western qui sont réactifs aux sondes anticorps CryIA(b) et à la signification ont été traités comme suit. Il ne devrait y avoir aucune inquiétude, étant donné que l'étude de toxicité orale aiguë aurait inclus ces fragments. Aucun des fragments extérieurs aux acides aminés 28-610 du noyau résistant à la trypsine (1-28 et 611-1150) possiblement présents dans les tissus du maïs ne montre d'homologie en termes d'acides aminés avec des toxines ou des allergènes connus. Les tests sur la protéine pleine longueur CryIA(b) appliqués aux mêmes séquences indiquent qu'elle est également non nocive. Le devenir digestif indique que la protéine est rapidement digérée et que le produit microbien commercial DIPEL renferme également de nombreux fragments.

La technique de Western appliquée après le traitement à la trypsine montre des bandes équivalentes et la présence du noyau de 63 kD dans les deux échantillons. Le MON 810 produit un produit protéique dont le noyau résistant à la trypsine est équivalent au noyau résistant à la trypsine de la protéine 754-10-1 B.t.k. en termes de taille et d'activité.

Dans un test plus récent que celui réalisé pour 754- 0-1, l'équivalence a été prouvée directement entre les protéines bactériennes et celles produites végétalemment dans le MON 810 en utilisant la méthode de transfert de Western, qui était « extrêmement sensible, spécifique aux protéines B.t.k. et permettant la comparaison du poids moléculaire apparent des protéines possédant une réactivité croisée immunologique dans des mélanges complexes ».

Les extraits foliaires de plusieurs lignées de maïs IP et de lignées de contrôle ont été digérés au moyen de la trypsine pour produire leur protéine noyau résistante à la trypsine HD-1 B.t.k; celle-ci a été comparée à la protéine noyau résistante à la trypsine de 63 kD produite au moyen de E. coli, et à la protéine de la lignée de maïs MON 801 de référence. Les lignées de maïs incluaient le MON 810 et sa contrepartie MON 818.

La méthode de transfert de Western (figure 10) montre une bande importante pour les MON 810 de même poids moléculaire que le matériel bactérien de référence. Des bandes plus petites sont également présentes et on suppose qu'il s'agit d'autres fragments de HD-1 B.t.k. Une bande de 20kD a été constatée dans tous les extraits (à

la fois lignée IP et lignée de contrôle) et on présume qu'elle représente une réactivité croisée non spécifique résiduelle non liée à la protéine HD-1 B.t.k.

« Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude prouvent clairement que la protéine HD-1 B.t.k. (en tant que noyau résistant à la trypsine) produite à la fois par E. coli et par la lignée de maïs IP analysées dans le cadre de cette étude sont équivalentes. ...l'équivalence prouvée... sert à justifier l'utilisation des données sur l'innocuité générées avec la protéine produite par E. coli (lot n° I92017) pour confirmer l'innocuité de la protéine HD-1 B.t.k. exprimée dans ces nouvelles lignées de maïs protégées contre les insectes. »

### Produits de dégradation et métabolisme

« La protéine CryIA(b) ne possède pas de produits de dégradation spécifiques dans les végétaux. Dans l'intestin de l'insecte, le milieu alcalin solubilise la protéine, qui est ensuite clivée par les protéases pour produire l'endotoxine activée. ... Comme on l'observe communément au moyen de la méthode de transfert de Western des protéines Bt, les polypeptides multiples sont apparents dans les extraits de plantes qui expriment le gène CryIA(b). Ils sont reconnus comme des produits de dégradation libérés du fait de l'activité protéasique, soit dans le végétal soit durant l'extraction. »

### Stabilité de l'insert

Le MON810 a été hybridé en divers génotypes du maïs pour produire plusieurs générations et l'efficacité de la lignée a été maintenue. La caractérisation moléculaire du MON810 provenait de la troisième génération de rétrocroisement et donc, l'insert unique semble intégré de manière stable. Les données de ségrégation (tableau 7) confirment la ségrégation d'un insert actif unique du gène CryIA(b) conformément à la génétique de Mendel.

Tableau 7 : Données de ségrégation de la descendance du MON810

Génération	Description	Réel	Prévu	Khi-carré
BC0F1 <sup>1</sup>	issu du croisement de R0 avec une lignée consanguine	44:47	45:5:45:5	0,044*
BC1F1 <sup>2</sup>	issu du croisement des plants de BC0F1 avec la même lignée consanguine utilisée pour croiser le plant R0	10:4	7:7	1,786*
BC1F2 descendance <sup>3</sup>	issu du croisement de plants BC0F2 individuels par un plant non transgénique contrôlé	69:181:77	81.75:163.5:81.75	4,138#

<sup>1</sup>exprimé en nombre de plants codants : le nombre de plants non codants est basé sur le dosage d'alimentation de l'ECB

<sup>2</sup>exprimé en nombre de plants codants : le nombre de plants non codants est basé sur la méthode ELISA appliquée à CryIA(b)

<sup>3</sup>exprimé en nombre d'épis-lignes avec un nombre homozygote de plants codants : nombre d'épis-lignes avec plants de ségrégation : nombre d'épis-lignes avec plants susceptibles d'être homozygotes basé sur le dosage d'alimentation de l'ECB

\* non significatif à  $p=0,05$  (khi-carré = 3,94, 1 df)

# non significatif à  $p=0,05$  (khi-carré = 5,99, 2 df)

Le gène *CryIA(b)* est stable sur sept générations de croisements avec un géniteur récurrent (B73) et six générations de croisements avec un second plant consanguin non apparenté (Mo17) (tableau 8). Les tests du khi-carré pour le rétrocroisement avec B73 et Mo17 n'ont pas donné des résultats s'écartant des attentes.

Tableau 8 : Stabilité du transfert génique basée sur les données de ségrégation pour les dérivés par rétrocroisement du MON810 avec deux lignées consanguines non apparentées (B73 et Mo17)

Génération <sup>1</sup>	Réel	Prévu	khi-carré
BC6F1 (B73)	8:13	10.5:10.5	0,762*
BC5F1 (Mo17)	11:11	11:11	0.045*

<sup>1</sup>données exprimées en nombre de plants codants : nombre de plants non codants basés sur la méthode ELISA appliquée à *CryIA(b)*

\*non significatif à  $p=0,05$  (khi-carré = 3,84, 1 df)

## Annexe H : Données agronomiques

### Essais de germination et autres données de base

Selon les essais réalisés à six emplacements répartis à l'échelle de la région du Corn Belt aux États-Unis, la germination du MON810 était élevée (tableau 9). Ceci appuie la « conclusion qu'il n'y avait aucune différence du point de vue de la germination ou de la dormance entre » le MON810 et le plan de contrôle.

Tableau 9. Résultats de la germination en champ pour le MON810 et le plan de contrôle

Lignée	Moyenne de germination	Fourchette
MON810	87,1 %	71,1-94,3 %
CONTRÔLE	90,6 %	78,9-98,3 %

### Sensibilités aux maladies et aux ravageurs

Le MON810 (et sa lignée soeur MON 809) a fait l'objet de tests aux États-Unis dans plus de 60 plantations situées dans au moins dix états et à Porto Rico depuis 1992. Le contrôle de la sensibilité aux maladies et aux insectes (en comparant la vigueur et la sensibilité générales) a été effectué durant les essais en champ. Aucune différence du point de vue de la qualité agronomique, de la sensibilité aux maladies et aux insectes autres que la pyrale du maïs (ECB) n'a été décelée entre les plants transgéniques et non transgéniques. Les maladies observées dans les champs incluaient : brûlure du Nord (*Exserohilum turcicum*), helminthosporiose du Sud (*Bipolaris maydis*), flétrissement bactérien (*Erwinia stewartii*), nielle commune du maïs (*Ustilago maydis*), virus rayé du maïs et rouille commune du maïs (*Puccinia sorghi*).

### Caractéristiques du rendement

On a comparé le rendement entre neuf emplacements des États-Unis et l'insertion du gène *CryIA(b)* dans le MON810 ne nuit pas au rendement, lorsqu'on fait la comparaison avec un hybride non transgénique, du même hybride dont l'un des parents était un rétrocroisement issu du MON810 (tableau 10).

Tableau 10 : Comparaison du rendement (boisseau/acre) des versions non transgéniques et MON810 des hybrides.

	Rendement
Contrôle	147,09
MON810	154,9

Des tests ont été réalisés sur le MON810 aux États-Unis dans plus de 60 plantations situées dans au moins dix états et à Porto Rico depuis 1992. Le contrôle de la sensibilité aux maladies et aux insectes (en comparant la vigueur et la sensibilité générales) a été effectué durant les essais en champ. Aucune différence du point de vue de la qualité agronomique, de la sensibilité aux maladies et aux insectes autres que la pyrale du maïs (ECB) n'a été décelée entre les plants transgéniques et non transgéniques. Les maladies observées dans les champs incluaient : brûlure du Nord (*Exserohilum turcicum*), helminthosporiose du Sud (*Bipolaris maydis*), flétrissement bactérien (*Erwinia stewartii*), nielle commune du maïs (*Ustilago maydis*), virus rayé du maïs et rouille commune du maïs (*Puccinia sorghi*).

## Annexe I : Interactions avec l'environnement

Les données relatives aux caractéristiques agronomiques et à l'interaction du VCN dans l'environnement ont été réunies et elles sont présentées au tableau 11.

Tableau 11 : Données environnementales

Caractéristique	Description comparative		Changement
	VCN	Contrepartie	
durée de vie (plante annuelle, biannuelle ou vivace)	annuelle	annuelle	aucun
vigueur végétative (biomasse)	73,7 cm <sup>1</sup>	74,5 cm <sup>1</sup>	-1,1 %
taux de survie hivernale (comptages des plantes)	semences seulement	semences seulement	aucun
période de floraison	161,72	146,42	+ 3,6 %
Précocité	154,13	148,63	+ 3,7 %
production de graines	181,4 bois/acre <sup>4</sup>	177,0 bois/acre <sup>4</sup>	+ 2,5 %
Dormance	faible	faible	aucun
<b>Caractéristiques de la reproduction</b>			
- fréquence d'allofécondation intraspécifique	même que la contrepartie	même que le VCN	aucun
- vecteurs de pollinisation croisée	même que la contrepartie	même que le VCN	aucun
- fertilité - mâle	oui	oui	aucun
- fertilité - femelle	oui	oui	aucun
- autocompatibilité	oui	oui	aucun
- reproduction asexuée	non	non	aucun
<b>Adaptation au stress</b>			
- biotique	résistant à l'ECB	vulnérable à l'ECB	LE VCN est protégé
- abiotique	aucun	aucun	aucun
- pesticides	aucun	aucun	aucun
Effets résiduels	aucun	aucun	aucun
<b>Composition</b>			
- protéines	13,1 %	6-16,1%	aucun
- lipides	3,0 %	2,9-6,1%	aucun
- autres	82,4	82,7	-0,4 %
toxines endogènes (définir)	ND	ND	
toxines non endogènes (définir)	CryIA(b)	aucun	Résistance à l'ECB
Autres observations	ND	ND	

<sup>1</sup>hauteur des plantes, moyenne de cinq hybrides expérimentaux

<sup>2</sup>température accumulée (unités de chaleur) requise pour atteindre le stade de la libération du pollen

<sup>3</sup>température accumulée (unités de chaleur) requise pour atteindre le stade de la floraison femelle

<sup>4</sup>rendement en l'absence d'ECB

## **Probabilité que le plan se comporte comme une mauvaise herbe ou devienne invasif**

L'expérience passée indique que le maïs ne se comporte généralement pas comme une mauvaise herbe, compte tenu de sa physiologie (spathe close). Lorsque le maïs récolté est transporté et que des grains sont disséminés en bordure de route, « on ne trouve pas de plants spontanés poussant comme des mauvaises herbes le long des clôtures, dans les fossés et en bordure de route... même si les semences de maïs peuvent hiverner dans la rotation des cultures avec le soja, on utilise des mesures mécaniques et chimiques pour le contrôle. ... Le maïs ne peut survivre sans l'aide de l'homme et il ne peut survivre comme mauvaise herbe. »

## **Biologie de la reproduction et de la survie**

La présentation précise que le phénotype des plants transformés sera très similaire au phénotype original et que sa capacité de survie comme mauvaise herbe ne changera pas. Les observations tirées des essais en plein champ au cours des saisons 1993 à 1995 « font la preuve que le mode et le taux de reproduction de la lignée MON810 protégée contre les insectes sont typiques des autres variétés de maïs. Le MON810 montre les mêmes caractéristiques distinctes de staminé (panicule) et de pistillé (soie) et son pollen est produit entièrement dans les inflorescences staminées avec anthèse (libération du pollen) synchrone avec l'émergence de la soie. Aucune différence dans la maturité des semences ou des plantes n'a été observée, même si dans certains essais, des plants non protégés contre les insectes ont mûri plus rapidement en raison des dommages de l'ECB provoquant une sénescence prématurée. Le rendement et la germination des semences (voir ci-dessus) étaient similaires à ceux des preuves de contrôle. « Il n'y a aucun changement de la biologie de reproduction de survie associé au phénotype protégé contre les insectes. »

## **Adaptation au stress**

L'entreprise avance ce qui suit sur le sujet : « la lignée de maïs MON810 protégée contre les insectes a été cultivée dans divers milieux dans la région du corn belt d'Amérique du Nord et dans d'autres pays. L'adaptation de la lignée MON810 au stress n'a pas été altérée du fait de la modification génétique, à l'exception de la protection conférée contre les dommages causés par l'alimentation de l'ECB. Les populations d'ECB sont très variables d'une saison à l'autre et elles ne constituent pas un facteur de limitation de la production de maïs au Canada. Les sensibilités aux maladies et aux ravageurs du MON810 sont par ailleurs inchangées. Plus récemment, les recherches universitaires ont indiqué une réduction potentielle de l'apparition de pourriture des tiges associée aux dommages causés par l'ECB (espèce fusarium) aux épis de maïs et de la production associée de micotoxines nocives. »



## **Croisement extérieur avec des espèces indigènes de Zea**

Le maïs s'hybride naturellement avec la téosinte au Mexique et au Guatemala, où la téosinte existe essentiellement comme mauvaise herbe en pourtour des champs de maïs cultivé. Dans une étude réalisée au Mexique, on a constaté que la fréquence des hybrides se situait entre 2 et 5 % de la population de téosinte. Il s'agit d'un «échange important de gènes entre une plante mauvaise herbe (c.-à.-d. la téosinte) et une plante apparentée cultivée (c.-à.-d. le maïs) ». L'hybride F1 est robuste et fertile, et peut être rétrocroisé avec le maïs.

L'aire de distribution géographique de la téosinte est la zone subtropicale, sèche selon les saisons, située le long des escarpements occidentaux du Mexique et du Guatemala et sur le plateau central du Mexique. À l'exception de plantations spéciales, il n'est pas cultivé aux États-Unis et on n'a pas signalé de cas où la plante ait poussé comme mauvaise herbe en bordure des plantations de maïs aux États-Unis.

Le *Tripsacum* est une espèce apparentée indigène. Des hybrides sauvages du *Tripsacum* avec le maïs n'ont pas été observés, mais les croisements se produisent seulement dans des circonstances particulières et la descendance est souvent stérile. *Tripsacum* spp. (au nombre de 16) sont des espèces indigènes de l'Amérique du Sud et centrale.

Selon la présentation, le croisement extérieur de plants transformés sera identique avec le croisement de plants non transformés.

## **Croisement extérieur avec des variétés de Zea cultivées**

Le maïs est pollinisé par le vent, et la distance que le pollen viable peut franchir dépend de la force et des configurations du vent, de l'humidité et de la température. Selon les observations réalisées, dans des conditions favorables, le pollen de maïs peut voyager sur une distance atteignant 3,2 kilomètres. La plupart des maïs (cornés, dentés, sucrés, à éclater) interpollinisent (certains maïs à éclater figurent dans les exceptions). « Le pollen de maïs est très vagabond » et chaque plant de maïs peut produire plus de 10 millions de grains de pollen.

«L'échange de gènes entre le maïs cultivé et le maïs transformé serait similaire à ce qui se produit naturellement à l'heure actuelle. ... la probabilité qu'un maïs se comportant comme une mauvaise herbe soit le produit d'un croisement extérieur avec du maïs cultivé semble extrêmement faible. Le flux génétique libre aurait lieu de manière similaire à ce qui se produit naturellement. La production de protéine B.t.k. CryIA(b) dans les semences produites ne serait pas problématique en raison de l'innocuité prouvée pour le maïs protégé contre les insectes.

Les distances types d'homologation recommandées (au moment de la présentation) entre les différents génotypes de maïs pour la production de semences hybrides commerciales sont au minimum de 200 mètres entre les semences mères et les autres

plants de maïs de type similaire. La distance peut être modifiée en fonction de la taille du champ, du nombre de lignes de bordure et des dates de maturité pour la floraison. Dans la présentation, il est souligné que si la semence hybride produite est de couleur ou de texture différente de celle des champs contaminants voisins, alors les distances et le nombre de lignes de bordure doivent être accrus.

### **Possibilité que le VCN devienne nuisible**

Les caractéristiques agronomiques des hybrides de maïs modifiés se sont avérées comprises dans la gamme de valeurs observées chez les maïs hybrides actuellement commercialisés, ce qui indique que les caractéristiques de croissance du maïs n'ont pas été modifiées par inadvertance. Les observations en champ n'ont pas révélé de modifications des sensibilités aux maladies et aux ravageurs, autres que l'ECB.

## Annexe J : Spécificité des caractères

### Allégations de non-toxicité

La présentation résume les impacts possibles sur les organismes non visés comme suit : « les protéines B.t. produites naturellement se sont avérées pratiquement non toxiques pour les poissons, les espèces aviaires, les mammifères et d'autres espèces non visées. Étant donné que les protéines B.t.k produites naturellement se sont avérées pratiquement non toxiques pour les poissons, les espèces aviaires, les insectes non visés, les mammifères et d'autres espèces non visées, on ne prévoit aucune incidence nuisible sur la faune et la flore du fait de la commercialisation de ces plantes. »

« La protéine CryIA(b) est insecticide seulement pour les lépidoptères. Seuls sept des 18 insectes observés étaient sensibles... et il s'agissait dans tous les cas de lépidoptères. Cette spécificité est directement imputable à la présence de récepteurs dans les insectes visés. L'activité sélective de l'endotoxine B.t.k. ne perturbera pas les populations d'insectes bénéfiques ou d'animaux non visés (p. ex., oiseaux, poissons). » L'application d'insecticides chimiques conventionnels affecte fréquemment les espèces non visées.

Les tests cités dans la documentation incluent les tests relatifs à des produits pesticides microbiens disponibles dans le commerce, comme DIPEL®, qui a fait l'objet de nombreuses évaluations d'innocuité pour l'homologation de pesticides; ils soulignent qu'ils sont « largement reconnus comme non toxiques pour les mammifères, les oiseaux et les poissons, ainsi que pour les insectes bénéfiques non visés, ce qui inclut les prédateurs et parasitoïdes des ravageurs lépidoptères et les abeilles domestiques ».

En utilisant le concept d'équivalence, les auteurs déclarent que les données sur l'innocuité soumises pour les produits microbiens renfermant la protéine « peuvent être appliquées à l'évaluation de l'innocuité de la protéine exprimée dans le MON810 et les lignées consanguines et hybrides issus de cette lignée ».

Les tests ont été réalisés en utilisant le noyau résistant à la trypsine de la protéine produite par E.coli décrite ailleurs dans le document, qui s'est avérée équivalente à la protéine exprimée par la plante.

Tests réalisés en utilisant la protéine noyau résistante à la trypsine (pollen, tissu ou extraits de la plante exclus)

*Larves et adultes d'abeilles domestiques (Aphis mellifera L.)*

Les abeilles domestiques peuvent butiner le pollen du maïs. La stabilité de la protéine noyau trypsine dans les solutions de sucrose et de miel dans des conditions non réfrigérées a été confirmée et une dose maximale de danger calculée, soit une concentration de la protéine supérieure à dix fois le niveau estimé requis pour une mortalité de 50 % (LC50) de plusieurs ravageurs lépidoptères visés. Le LC50 pour les

larves et les adultes d'abeilles domestiques était supérieur à 20 ppm, la dose la plus forte administrée, aussi, la dose sans effet observable (NOEL) a été fixée à 20 ppm.

#### *Larves de chrysope vertes (Chrysopa carnea)*

Les chrysopes, des insectes prédateurs bénéfiques, sont observés dans les champs de maïs. On n'a trouvé aucune preuve d'effets nocifs lorsque les larves étaient alimentées au moyen d'oeufs de spongieuse imprégnés d'une concentration nominale de 16,7 ppm de la protéine CryIA(b) durant sept jours. Aussi, le LC50 a été fixé à 16,7 ppm, la dose la plus forte utilisée pour les tests.

#### *Hyménoptères parasites*

L'organisme test (*Brachymeria intermedia*), un parasite bénéfique de la mouche domestique (*Musca domestica*), a été exposé à la protéine dans une concentration de 20 ppm dans une solution de miel/eau durant 30 jours. Les guêpes n'ont montré aucun signe de toxicité ou de mortalité reliée au traitement et les LC50 et NOEL ont été fixés à 20 ppm, la plus forte dose administrée.

#### *Coccinelles convergentes (Hippodamia convergens)*

Les coccinelles convergentes, des insectes prédateurs bénéfiques communs qui se nourrissent d'aphides, et d'autres insectes des végétaux, sont observées couramment sur les mauvaises herbes et les cultures vivrières. Alimentées au moyen de la même solution d'essai que les guêpes sur neuf jours, elles n'ont également montré aucune mortalité ou signe de toxicité associés au traitement; aussi, le LC50 et le NOEL ont été fixés à 20 ppm, la dose la plus forte.

#### *Collembole*

Au moyen de protéines insecticides, ce qui inclut la protéine insérée dans le MON810, des essais d'alimentation ont été réalisés sur deux espèces de collemboles (*Folsomia candida*, *Xenylla grisea*) des invertébrés du sol non visés qui pourraient entrer en contact avec les protéines B.t. de résidus de récolte durant la décomposition dans le sol. Les études indiquent que l'activité biologique de la protéine CryIA(b) du maïs se dissipe rapidement dans le sol, 50 à 90 % de l'activité ayant disparu respectivement en 2 et en 15 jours. L'objet de ces tests toxicologiques consistait à évaluer les risques écologiques potentiels pour les organismes non visés bénéfiques. Les protéines (à 200 ppm) et le contrôle positif (insecticide chimique Chloropyrifos comme le Lorsban 4E) ont été intégrés à de la levure de bière et lyophilisés pour préparer une diète pour les insectes, qui ont été exposés dans les microécosystèmes de la boîte de Pétri durant 21 jours. On a conclu que les protéines Bt ne posaient aucun risque toxicologique pour les espèces de Collembola vivant dans le sol (tableau 12).

Tableau 12 : Survie et reproduction des espèces de Collemboles exposées aux protéines Bt et aux contrôles (moyenne ± écart-type)

Traitement	<i>F. candida</i> (adultes)	<i>F. candida</i> (descendance par adulte)	<i>X. grisea</i> (adultes + descendance)
Protéine CryIA(b) Bt	9,8 ± 0,4	15,1 ± 3,0	98,8 ± 50,7
Contrôle pour Bt	9,6 ± 0,6	13,7 ± 2,3	120,7 ± 32,1
Chloropyrifos- 200 ppm	0	0	16,8 ± 12,4
Chloropyrifos - 20 ppm	0,25 ± 0,5	0	15,3 ± 10,2
Chloropyrifos - 2,0 ppm	9,8 ± 0,5	13,3 ± 3,1	56,0 ± 44,6
Chloropyrifos - 0,2	9,0 ± 0,8	14,5 ± 1,3	28,8 ± 21,6
Chloropyrifos - 0,0	9,3 ± 1,2	12,5 ± 1,3	40,3 ± 20,7

Lombrics : Les tests effectués sur des lombrics durant 14 jours (*Eisenia fetida*) ont révélé que le LC50 du CryIA(b) trypsinisé est supérieur à 200 mg/kg de sol sec, le NOEL étant fixé à 200 mg/kg de sol sec (200 ppm). Les observations effectuées sur les lombrics incluaient le comportement d'enfouissement et les poids corporels. Le contrôle positif était le chloroacétamide à des concentrations de 14, 30 et 60 mg a.i./kg de sol sec. La mortalité moyenne pour le contrôle (15 %) et pour les 200 mg/kg de protéine CryIA(b) (25 %) n'était pas sensiblement différente. Le poids corporel moyen (mg) pour les contrôles a diminué d'environ -5 avec une augmentation de 57,5 mg pour les lombrics exposés à la protéine CryIA(b). « Le changement du poids corporel était variable entre les répétitions individuelles. Toutefois, il n'y avait aucun effet apparent relié au traitement sur le poids corporel ». Pour le chloroacétamide, la mortalité était de 100 % pour les essais de 30 et de 60 mg/kg et de 30 % pour l'ajout de 15 mg/kg au sol. La réduction moyenne du poids corporel pour le groupe 15 mg/kg était de 37,5 mg.

### Devenir de la protéine CryIA (B)

Les résidus de maïs, renfermant de faibles concentrations de protéine CryIA(b), peuvent être enfouis dans le sol ou laissés à la surface (travail de conservation du sol/zéro). Le devenir dans l'environnement a été déterminé en mesurant le taux de dissipation de la protéine CryIA(b) lorsqu'elle est ajoutée au sol sous forme de protéine purifiée et en tant que composante du tissu du maïs. Les niveaux utilisés pour les essais incorporés au sol étaient trois fois plus élevés que la concentration maximum prévue dans les conditions du champ.

Le taux de disparition (DT50) de la protéine CryIA(b) dans trois systèmes : 1) maïs sans contact avec le sol; 2) maïs mélangé au sol et 3) protéine purifiée mélangée au sol était : 1) 25,6 jours, 2) 1,6 jour et 3) 8,3 jours. Ce taux de disparition est comparable à celui observé avec les produits de Btk microbiens. Cela indique une disparition rapide à la surface (aucun travail du sol) et lorsqu'il y a incorporation au sol, et que la protéine ne devrait avoir aucun effet délétère sur la microflore et la faune du sol.

### Effets potentiels sur la biodiversité

Comme nous l'avons précisé précédemment, la protéine Btk est indigène à l'environnement et elle n'est pas réputée toxique pour les mammifères, le poisson, les oiseaux et d'autres espèces non visées; aussi, aucun effet nocif n'est prévu pour la

faune et la flore. « Aucun lépidoptère en voie de disparition ou menacé, selon la liste du 50CFR 17.11 ou 17.12, ne s'alimente à même les plants de maïs. » Le tableau 13 résume les interactions et les effets dans les écosystèmes contrôlés et naturels.

Tableau 13 : Effets du VCN sur les paramètres de l'écosystème

Effets de la dissémination	Écosystème naturel				Écosystème contrôlé			
	Degré de changement	Portée géographique	Durée	Impact relatif	Degré de changement	Portée géographique	Durée	Impact relatif
Biodiversité : population végétale	0	nationale	années	0	0	locale	mois	0
Population animale	0	"	"	0	0	"	"	0
Population microbienne	0	"	"	0	0	"	"	0
Présence / persistance des substances	0	"	"	0	0	"	"	0
Durabilité	0	"	"	0	+	"	"	+
Pratiques agronomiques/ silvicoles	0	"	"	0	+	"	"	+
Conservation des ressources	0	"	"	0	0	"	"	0
Autres préoccupations (p. ex., santé et sécurité au travail)	0	"	"	0	+	"	"	+
Changements de la qualité environnementale globale	0	locale		0	+	"	"	+

## **Annexe K : Culture**

### **Zone de production proposée**

Le MON 810 sera disponible pour utilisation dans toutes les zones de culture du maïs, mais on ne prévoit pas qu'il modifie les régions géographiques normales de production du maïs ou entraîne une augmentation importante de la superficie cultivée plantée en maïs, étant donné que l'infestation d'ECB n'est pas un facteur de limitation de la production.

### **Modification des pratiques culturales**

« Les pratiques culturales, les protocoles de récolte et post-récolte, ne varieront pas par rapport à ceux qui sont traditionnellement utilisés pour la culture du maïs et la distribution de produits de maïs au Canada ». On cite les avantages suivants :

- méthode plus fiable et plus économique de contrôle de l'ECB; avantages équitables pour les petits et les gros cultivateurs, étant donné qu'aucune main-d'œuvre, planification ou machinerie supplémentaire ne sont nécessaires;
- réduction de l'utilisation des insecticides pour contrôler l'ECB;
- réduction de la fabrication, de l'expédition et de l'entreposage d'insecticides chimiques;
- réduction de l'exposition des travailleurs aux insecticides;
- bonne compatibilité avec la GIP et les systèmes agricoles durables;
- contrôle des insectes sans nuire aux espèces non visées et aux insectes bénéfiques;
- réduction potentielle de l'apparition de pourriture des tiges associée aux dommages causés par l'ECB aux épis de maïs et à la production de mycotoxines.

## Annexe L : Toxicité et allergénicité

La séquence d'acides aminés du MON 810 a été comparée à des toxines protéiques connues. La similitude avec une toxine connue pourrait justifier des tests toxicologiques pour traiter l'incidence potentielle de l'homologie. La protéine HD-1 Btk a été comparée à 2 632 séquences d'acides aminés de toxines tirées de bases de données génétiques du domaine public (GenBank, EMBL, PIR et Swiss Prot), pour homologie. Les résultats confirment que la protéine HD-1 Btk est homologue à la protéine cristalline insecticide Bt, mais aucune homologie des acides aminés n'a été détectée pour les autres toxines protéiques. La correspondance la plus élevée est illustrée à la figure 16.

**Best sequence similarity of a toxin and E.i.A. HD-1**  
 A 34 amino acid overlap with 71% similarity (percent of residues having identical or conservative substitutions) and 39% identity to *Bordetella pertussis* dermonecrotic toxin is shown. Positions of sequence identity (|) and positions having conservative substitutions (:) are indicated. Amino acid positions are indicated above (E.i.A. HD-1) or below (*Bordetella pertussis* dermonecrotic toxin = Bpu 106).

	310	320	330	340	350	360
E.i.A. HD-1	ITVTTDAIRGETYNSGQIDNSPVPFSQPEPTFFLTOTMNSAAPPQQRIVAGLGGVYREL					
				:     :   : :		
Bpu 106	RSTRVDFVGSIVFDSISLLASVFSIGGELGSPFRSTQIGRLSPVVRKRLMGLSQRLARREV					
	690	700	710	720	730	740
E.i.A. HD-1	DSTLYRPFPSIGINMQQLSVLDQTEFAYSTSSNLPRAVTRKSGTVGDLDEIIPQSNVTF					
Bpu 106	LKKLPAIIGASGLRLSRSLVDLYEITFEPVFIHRLVAGVYSATTVSGRNGQATLQAQAFSA					
	750	760	770	780	790	800

Figure 16 : Meilleure homologie d'une séquence d'une toxine et de la protéine HD-1 Btk.

## Étude de gavage intensif de souris

Une étude de toxicité orale aiguë (sept jours) a été réalisée sur des souris albinos en utilisant la protéine produite par *E. coli* (transformée en noyau résistant à la trypsine) dont on a vérifié la pureté, l'efficacité et la stabilité. La protéine a été administrée par gavage aux souris à des doses visées de 0, 400, 1 000 et 4 000 mg/kg. La dose la plus forte correspond au concept de la dose de danger maximum énoncée dans les *US Subdivision M Guidelines for biochemical pesticides*. Un groupe a reçu une dose de 4 000 mg/kg d'albumine bovine (BSA) comme contrôle protéique.

Aucun effet nocif relié au traitement n'a été observé (tableau 14) et aucune différence statistique entre les mesures du poids corporel et de la consommation alimentaire n'a été constatée. Aucune différence n'a été constatée dans la pathologie clinique entre les groupes. Le LC50 de la protéine (tronquée) HD-1 Btk chez les souris est supérieure à 4 000 mg/kg avec le NOEL fixé à cette valeur.



Tableau 14 : Résultats du test de gavage aigu des souris avec la protéine CryIA(b).

Groupe de test	Poids avant le test (g)	Poids à la fin (g)	Consommation alimentaire (moyenne g/jour)
Véhicule de contrôle (tampon)	31,1 [25,5]	30,8 [25,1]	5,3 [6,4]
Contrôle (BSA)	31,1 [25,4]	31,0 [24,7]	6,2 [7,3]
400 protéines Bt	31,1 [25,4]	30,5 [25,2]	5,3 [8,0]
1 000 protéines Bt	31,0 [25,3]	31,1 [25,0]	5,3 [8,0]
4 000 protéines Bt	31,0 [25,5]	30,5 [25,5]	5,5 [8,0/7,4]

[femelles]

## Allergénicité

Les humains consomment quotidiennement de grandes quantités de protéines et les réactions allergiques sont rares. Parmi les facteurs à examiner : la source du gène introduit dans les végétaux est-il réputé allergène? Bt n'a pas d'antécédents pour ce qui est de provoquer des allergies. « En plus de 30 ans d'utilisation commerciale, il n'y a eu aucun signalement d'allergénicité du Bt, ce qui inclut les allergies professionnelles associées à la fabrication de produits renfermant du Bt. » De plus, les allergènes protéiques doivent être stables dans la digestion peptique et tryptique et dans les conditions acides du système digestif pour atteindre et traverser la muqueuse intestinale et provoquer une réponse allergène. Les tests réalisés ci-dessus indiquent que la protéine CryIA(b) ne survit pas à une digestion gastrique simulée. Un autre facteur commun aux protéines allergènes est qu'elles se retrouvent à des concentrations élevées dans les aliments (p. ex., allergène dans le lait, le soja, les arachides). Ce n'est pas le cas avec la protéine CryIA(b) qui est présente à un taux d'environ 0,19-0,39 µg de poids frais de grains de maïs.

La comparaison de séquences d'acides aminés avec des allergènes et des gliadines connus permet une première approximation utile de l'allergénicité potentielle et de l'association avec les maladies coeliaques. Une base de données de 219 séquences protéiques associées aux allergies et aux maladies coeliaques constituée à partir de bases de données génétiques (GenBank, EMBL, PIR et Swiss Prot) a fait l'objet d'une recherche de séquences similaires à la protéine HD-1 Btk. « La plupart des allergènes alimentaires... majeurs ont été signalés et les épitopes de liaison de l'IgE importants de nombreuses protéines allergènes ont été cartographiés. La longueur de peptides optimale pour la liaison se situe entre 8 et 12 acides aminés. Les épitopes de lymphocyte-T de protéines allergènes et les fragments peptidiques ont une longueur apparente d'au moins 8 acides aminés. La conservation exacte des séquences d'épitopes est observée dans les allergènes homologues d'espèces variées... on définit comme test de comparaison des séquences, pertinent d'un point de vue immunologique pour vérifier la similarité,... la correspondance d'au moins 8 acides aminés identiques

contigus. » Aucune homologie significative d'un point de vue biologique ou similitude de séquences significative d'un point de vue immunologique n'ont été constatées. La meilleure correspondance se trouve à la figure 17. Les résultats prouvent que la protéine HD-1 Btk ne partage aucune similitude importante avec des protéines allergènes ou gliadines connus.

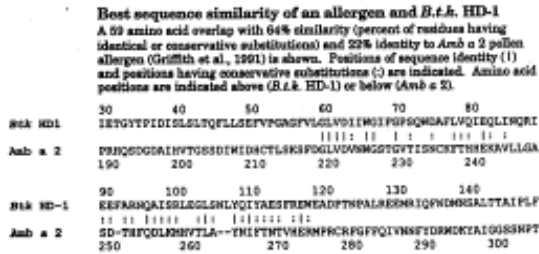


Figure 17. Meilleure similitude des séquences entre un allergène et la protéine HD-1 BTK

En sommaire, les faibles concentrations en protéine dans le maïs, combinées à la labilité digestive et à l'absence d'homologie avec des séquences allergènes connues, indiquent que cette protéine ne possède pas de propriétés allergènes. En combinaison avec les antécédents d'utilisation comme agent de contrôle microbien sans problèmes d'allergie, cela indique qu'il n'y a pas de raison de croire que le CryIA(b) devrait soulever des risques importants d'allergie en cas de consommation de produits fabriqués au moyen de maïs protégé contre les insectes.

## Annexe M : Étude d'alimentation animale

### Étude d'alimentation des colins de Virgine (*Colinus Virginianus*)

L'objet de cette étude (à noter que cette étude a été réalisée avec une autre lignée de maïs IP, le MON 801) consiste à évaluer la salubrité des repas de maïs protégé contre les insectes servant à l'alimentation des colins. Les oiseaux ont été nourris avec jusqu'à 10 % p/p (100 000 ppm) de farine de grains de maïs brut, ce qui équivaut à 138 grains/kg de poids corporel/oiseau/jour. Aucune mortalité n'a été observée et aucune différence n'a été constatée dans le poids corporel, la consommation alimentaire (tableau 15), l'apparence ou le comportement entre le maïs de contrôle et le maïs IP durant les cinq jours de test.

Le NOEL a été considéré comme supérieur à 10 % p/p et les grains de maïs IP ont été considérés comme comparables en salubrité à la lignée de contrôle génitrice. « Aucune étude d'alimentation complémentaire n'a été réalisée avec les grains ou la farine de maïs MON 810. »

Tableau 15 : Étude d'alimentation des colins de Virgine (cinq jours)

Groupe	Test (ppm)	Poids corporel (g)		Consommation alimentaire (g/oiseau/jour)	
		avant	après	jour 0-1	jour 4-5
Diète basale	0	20 ± 3	28 ± 4	9	7
	0	19 ± 2	26 ± 3	6	5
	0	21 ± 3	30 ± 6	9	8
Géniteurs	50000	20 ± 3	30 ± 4	7	8
	100000	20 ± 3	28 ± 3	7	10
Maïs IP	50000	20 ± 3	31 ± 3	9	8
	100000	20 ± 3	29 ± 5	8	9

## Annexe N : Données compositionnelles

### Données compositionnelles

Les échantillons requis pour l'analyse compositionnelle ont été prélevés au même moment et sur les mêmes six sites utilisés pour l'analyse des niveaux d'expression dans les grains de maïs pour une expérience ponctuelle.

Les échantillons de semences de maïs (grain) de MON 810 et de la lignée de contrôle MON 818 ont été analysés du point de vue des composants suivants et ceux-ci ont été comparés aux valeurs fournies dans la documentation :

- constituants immédiats (teneur en eau, protéines, cendres, lipides, fibres brutes)\*;
- calories;
- glucides;
- amidon;
- profil des acides gras\*;
- profil du sucre;
- composition en acides aminés\*;
- tocophérols\*;
- acide phytique\*;
- minéraux (calcium, phosphore)\* selon le sommaire du tableau 16.

Les paramètres avec un astérisque (\*) sont pris en compte pour les évaluations de l'alimentation animale, alors que les autres paramètres (souvent obtenus au moyen de calculs) ne sont pas couramment pris en compte.

Les glucides n'ont pas été mesurés mais déduits au moyen du calcul suivant : % glucides = 100 % - (% protéines + % lipides + % cendres + % teneur en eau). De plus, les calories étaient un paramètre calculé en utilisant la formule suivante approuvée par l'USDA : calories (kcal/100g) = (4 \* % protéines) + (9 \* % lipides) = (4 \* % glucides).

Tableau 16 : Comparaison de l'analyse compositionnelle de grains de maïs MON 810 avec la lignée de contrôle (MON 818) et les valeurs de la documentation.

Composition	MON810 <sup>1</sup> Moyenne (fourchette) <sup>2</sup>	MON 818 moyenne (fourchette) <sup>2</sup>	Moyenne des valeurs de la documentation <sup>4</sup> (fourchette) [MON 800/801, fourchette]
<b>ANALYSE IMMÉDIATE</b>			
Protéines <sup>3</sup>	13,1 (12,7-13,6)	12,8 (11,7-13,6)	9,5 (6,0-12,0) 12,3 (9,7- 16,1) [11,2-13,6]
Lipides	3,0 (2,6-3,3)	2,9 (2,6-3,2)	4,3 (3,1-5,7), 4,6 (2,9-6,1) [3,8-4,2]
Cendres <sup>3</sup>	1,6 (1,5-1,7)	1,5 (1,5-1,6)	1,4 (1,1-3,9) [1,5-1,8]
Glucides <sup>3</sup>	82,4 (81,8-82,9)	82,7 (81,7-83,8)	non déclaré [80,8-83,0]
Calories/100g	408,4 (407,0-410,1)	408,5 (406,0-410,1)	non déclaré [412,6-415,7]
Teneur en eau %	12,4 (11,0-14,4)	12,0 (10,6-14,2)	16,0 (7-23) [13,0-15,8]
<b>COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS - ESSENTIELS POUR LA NUTRITIONS<sup>5</sup></b>			
Méthionine	1,7 (1,6-1,9)	1,7 (1,6-1,7)	1,0-2,1 [2,0-2,6]
Cystine	2,0* (1,9-2,1)	1,9 (1,8-2,0)	1,2-1,6 [1,9-2,3]
Lysine	2,8 (2,5-2,9)	2,8 (2,7-2,9)	2,0-3,8 [2,6-3,4]
Tryptophane	0,6* (0,5-0,7)	0,6 (0,4-0,6)	0,5-1,2 [0,5-0,6]
Thréonine	3,9 (3,7-4,4)	3,8 (3,7-3,9)	2,9-3,9 [3,9-4,2]
Isoleucine	3,7 (3,3-4,1)	3,8 (3,6-4,0)	2,6-4,0 [3,5-3,8]
Histidine	3,1* (2,9-3,3)	2,9 (2,8-3,0)	2,0-2,8 [2,8-3,3]
Valine	4,5 (4,1-4,9)	4,6 (4,3-4,8)	2,1-5,2 [4,2-4,8]
Leucine	15,0 (14,1-16,7)	14,5 (13,8-15,0)	7,8-15,2 [13,6-14,5]
Arginine	4,5 (4,2-4,7)	4,5 (4,2-4,7)	2,9-5,9 [4,1-5,0]
Phénylalanine	5,6* (5,2-5,6)	5,4 (5,2-5,6)	2,9-5,7 [5,2-5,6]
Glycine	3,7 (3,4-4,0)	3,7 (3,5-3,8)	2,6-4,7 [3,4-4,2]
<b>ACIDES AMINÉS - NON ESSENTIELS<sup>5</sup></b>			
Alanine	8,2* (7,8-8,9)	7,8 (7,5-8,0)	6,4-8,0 [7,8-8,2]
Acide aspartique	7,1 (6,4-8,2)	6,6 (6,3-6,8)	5,8-7,2 [6,7-7,3]
Acide glutamique	21,9 (20,4-24,4)	21,1 (20,1-21,6)	12,4-19,6 [19,9-21,4]
Proline	9,9* (9,7-10,5)	9,6 (9,4-9,8)	6,6-10,3 [9,0-9,4]
Sérine	5,5* (5,3-5,9)	5,2 (5,1-5,4)	4,2-5,5 [5,5-6,1]
Tyrosine	4,4* (4,1-4,8)	4,0 (3,9-4,1)	2,9-4,7 [3,8-4,3]
<b>ACIDES GRAS<sup>6</sup></b>			
Palmitiques (16:0)	10,5 (10,2-11,1)	10,5 (10,2-10,7)	7-19 [10,2-10,9]
Stéariques (18:0)	1,9 (1,7-2,1)	1,8 (1,8-1,9)	1-3 [1,6-3,1]
Oléiques (18:1)	23,2 (21,5-25,4)	22,8 (21,6-23,9)	20-46 [21,2-25,9]

Linoléiques (18:2)	62,6 (59,5-64,7)	63,0 (61,8-64,6)	35-70 [58,9-65,0]
Linoléiques (18:3)	0,8 (0,7-0,9)	0,9 (0,8-0,9)	0,8-2 [0,9-1,1]
<b>GLUCIDES ET FIBRES<sup>7</sup></b>			
Amidon %	67,6 (65,3-69,7)	66,9 (64,6-69,0)	64-78,0 [63,7-71,5]
Fibre brute %	2,6* (2,5-2,8)	2,4 (2,3-2,5)	2,0-5,5 [1,98-2,61]
Sucres <sup>8</sup>			
– fructose	0,32 (0,23-0,35)	0,27 (0,22-0,40)	[0,47-0,96]
– glucose	0,44 (0,34-0,47)	0,93 (0,79-1,12)	[0,47-1,03]
– sucrose	0,93 (0,79-1,12)	0,93 (0,68-1,11)	[0,40-0,94]
Acide phytique %	0,86 (0,81-0,91)	0,84 (0,79-0,91)	0,7-1,0 [0,45-0,57]
<b>TOCOPHÉROLS (mg/kg)</b>			
alpha	10,4 (9,7-11,3)	10,9 (9,9-12,1)	3,0-12,1 [7,3-12,3]
béta	8,5* (8,1-9,2)	7,5 (7,0-7,9)	[7,9-10,7]
gamma	20,2 (15,3-24,8)	21,6 (18,8-27,8)	[21,7-42,5]
<b>COMPOSANTS INORGANIQUES<sup>7</sup></b>			
calcium %	0,0036* (0,0033-0,0039)	0,0033 (0,0029-0,0037)	0,01-0,1 [0,003-0,004]
phosphore %	0,358 (0,334-0,377)	0,348 (0,327-0,363)	0,26-0,75 [0,311-0,368]

<sup>1</sup>les valeurs avec un \* sont statistiquement différentes du MON 818

<sup>2</sup>les valeurs déclarées sur les moyennes de six échantillons provenant des six sites. Les fourchettes correspondent à la valeur la plus élevée et la plus faible de l'ensemble des sites.

<sup>3</sup>poids sec des échantillons en pourcentage

<sup>4</sup>lorsqu'il y a plus d'une valeur, cela indique plus d'une source publiée

<sup>5</sup>les valeurs des acides aminés déclarés sont en pourcentage de la protéine totale

<sup>6</sup>les valeurs des acides gras sont en % des lipides totaux. Les autres acides gras étaient inférieurs à la limite de détection de l'essai

<sup>7</sup>les valeurs sur la base du poids sec

<sup>8</sup>sucres mesurés en g/100g. Le galactose, le lactose et le maltose ont également été mesurés, mais les valeurs étaient inférieures à la limite de détection.

On n'a constaté aucune différence significative pour les variables protéines, lipides, cendres, glucides, calories et teneur en eau entre le maïs IP et sa lignée de contrôle; et tous deux sont situés en deçà des valeurs déclarées dans la documentation.

Le MON810 renfermait huit acides aminés (cystine, tryptophane, histidine, phénylalanine, alanine, proline, sérine et tyrosine) qui étaient statistiquement différents de la lignée de contrôle. Les valeurs moyennes de six d'entre eux (tous sauf la cystine et la histidine) se situent en deçà des valeurs de la documentation. La cystine et la histidine des deux lignées étaient plus élevées statistiquement que les valeurs de la documentation, mais se situaient dans la fourchette (1,9-2,3%) observée pour deux

lignées similaires (MON 800/801). La teneur en histidine du MON810 (3,1%) se situe en deçà de la fourchette d'une autre étude précédente sur deux lignées ayant des antécédents similaires.

Pour les acides gras et les glucides mesurés (amidon, fructose, glucose, sucrose et acide phytique), aucune différence significative n'a été constatée entre la lignée de contrôle et la lignée IP. Les valeurs des fibres brutes dans les grains de MON810 (2,6 %) étaient statistiquement différentes du MON 818, mais les deux valeurs se situaient dans la fourchette déclarée dans la documentation (2,0-5,5 %).

Les tocophérols sont présents naturellement dans l'huile de maïs et ils ont une activité en termes de vitamine E. Les tocophérols gamma sont actifs au dixième des tocophérols alpha et ils ne sont donc pas considérés comme un composant important du grain de maïs. Les valeurs du MON810 pour les tocophérols alpha et gamma étaient similaires statistiquement aux lignées de contrôle, mais différentes pour le tocophérol bêta.

En ce qui concerne les teneurs en calcium et en phosphore minéraux, les chiffres pour le calcium dans le MON810 étaient statistiquement plus élevés que le MON 818, mais se situaient dans les fourchettes déclarées pour les tests réalisés sur le MON 800/801. Aucune différence statistique n'a été constatée pour le phosphore..

L'entreprise conclut : «À partir de ces données, nous avons conclu qu'il n'y a pas de différences de composition significatives entre les lignées de maïs IP... et la lignée de contrôle, le MON 818 ».

Selon les conclusions de l'analyse nutritionnelle, « la composition nutritionnelle ... se situe dans les ordres de grandeur des mesures de chaque élément nutritif pour les lignées de maïs non modifiées. On peut conclure qu'il ne semble y avoir aucun effet significatif sur les teneurs en éléments nutritifs des plants de maïs. Le phénotype n'était affecté dans aucune des nombreuses dimensions qui ont été mesurées. Parmi les vitamines ou les minéraux mesurés, aucune différence concrète n'a été signalée. En termes de composition nutritionnelle, le MON810 est considéré comme essentiellement équivalent au maïs régulier. »