

5. Caractérisation de la ou des modification(s) génétique(s)

Analyse moléculaire de l'insert d'ADN recombiné

La caractérisation d'une plante à ADN recombiné au niveau moléculaire vise à fournir des informations sur la composition et l'intégrité de l'ADN inséré, le nombre et la localisation dans le génome des sites d'insertion simples ou multiples et le niveau d'expression de la (des) protéine(s) nouvelle(s) dans le temps et dans les différents tissus et milieux.

Comme on l'a vu dans la Section 4, le processus de production d'une plante à ADN recombiné peut donner naissance à une plante transformée contenant un seul ou plusieurs inserts présents dans un ou plusieurs endroits du génome de la plante hôte.

Les organismes de réglementation examinent les informations sur l'intégrité et le nombre de copies de l'ADN inséré dans les plantes transgéniques. Les biotechnologistes s'efforcent généralement de minimiser le nombre et la taille des copies pour faciliter le processus de réglementation en produisant moins de modifications génétiques qu'il faudra évaluer. Cependant, les plantes transgéniques contenant plusieurs copies de l'ADN inséré ne sont pas nécessairement moins «sûres» que des plantes comparables ne contenant qu'une seule copie.¹⁰

Il est indispensable de connaître les locus

d'insertion du ou des transgène(s) dans le génome de la plante pour déterminer si les gènes existants ou les séquences régulatrices ont été affectés par l'insertion, ce qui pourrait se traduire par une altération des modes d'expression des gènes et, partant, du phénotype de la plante. Pour déterminer si l'ADN inséré a pu donner naissance à de nouvelles molécules protéiques, on a recours à des analyses bioinformatiques des séquences d'ADN pour déceler la présence de cadres ouverts de lecture (ORF) à l'intérieur et autour de l'insert d'ADN.

Un cadre ouvert de lecture est une partie d'un gène qui est transcrite pour produire de l'ARN. L'analyse bioinformatique est généralement centrée à la fois sur les ORF nouvellement introduits présents dans l'insert d'ADN et sur la présence potentielle ou la création de nouveaux ORF produits par l'insertion aléatoire d'ADN dans les ORF existants du génome de la plante.

Une caractérisation moléculaire détaillée de l'ADN recombiné peut résoudre des problèmes liés à d'éventuels effets de position entraînant une expression

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 30. Dans le but d'aboutir à une compréhension claire de l'impact sur la composition et la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné, une caractérisation moléculaire et biochimique détaillée de chaque modification génétique devrait être effectuée.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 31. Des informations concernant les insertions d'ADN dans le génome de la plante devraient être fournies; celles-ci devraient inclure:

- A) la caractérisation et la description des matériels génétiques insérés;
- B) le nombre de sites d'insertion;
- C) l'organisation du matériel génétique inséré à chaque site d'insertion, en incluant le nombre de copies et des données sur la séquence du matériel inséré et sur la région environnante, suffisantes pour identifier toutes substances exprimées du fait du matériel inséré, ou, lorsque cela est plus approprié, d'autres informations telles que les transcrits ou les produits d'expression, pour identifier toutes nouvelles substances qui peuvent être présentes dans l'aliment; et
- D) l'identification de tout cadre de lecture ouvert au sein de l'ADN inséré ou créé par les insertions avec l'ADN contigu du génome de la plante, y compris de ceux qui pourraient conduire à la création de protéines fusion.

¹⁰ L'un des événements de transformation contenant un grand nombre de copies de transgènes, qui a été approuvé par le Gouvernement canadien, est représenté par une lignée de canola (*Brassica napus*; événement de transformation 23-198, 23-18-17) mise au point en introduisant un gène codant la thioestérase du laurier de Californie (*Laurus nobilis*) afin d'augmenter les concentrations d'acide laurique (12:0) et, dans une moindre mesure d'acide myristique (14:0). On a estimé que l'événement de transformation 23 d'origine possédait 15 copies des gènes au niveau de cinq locus génétiques indépendants, comme le montrent les analyses par transfert Southern et les analyses de ségrégation.

variable des gènes, la modification de nombreux caractères (effets pléiotropes) découlant de l'insertion d'ADN ou la mise sous silence des gènes résultant d'une surexpression de l'ADN inséré. Cependant, en l'absence d'autres données empiriques, ces analyses moléculaires ne permettent pas de prédire des effets inattendus sur les concentrations de nutriments essentiels, de facteurs antinutritionnels ou de toxines endogènes. C'est pourquoi on effectue des analyses de composition supplémentaires, selon les méthodes décrites aux chapitres 6 à 8.

Lorsque la modification débouche sur l'expression d'une protéine nouvelle, le matériel végétal est caractérisé pour déterminer la composition biochimique et la fonction du ou des nouveau(x) produit(s) du gène.

Plusieurs méthodes permettent de vérifier et de mesurer l'expression des caractères introduits dans une plante à ADN recombiné. Pour les caractères dérivés de protéines nouvelles, les techniques sérologiques sont privilégiées. Ces techniques (par exemple le buvardage de Western (immunotransfert) ou le dosage immunoenzymatique [ELISA]) servent à détecter la présence du produit transgénique et à quantifier son niveau dans l'échantillon. Si le nouveau caractère n'entraîne pas l'expression d'une protéine nouvelle ou modifiée¹¹ mais par exemple, des séquences anti-sens d'ARN, on utilise d'autres techniques (comme le transfert de Northern) pour mesurer la production du transcrit.

Outre la caractérisation biochimique directe du trait inséré, les organismes de réglementation font généralement réaliser des études pour évaluer la plante à ADN recombiné dans différentes conditions de culture. Ces études peuvent montrer que le trait recherché s'exprime au stade biologique voulu du cultivar, de la façon prévue, et de manière stable de génération en génération et dans différents environnements.

La concentration globale des nouvelles protéines exprimées dans les tissus de plantes à ADN recombiné est faible, souvent inférieure à 0,1% du poids sec. Des études sur la prévention des risques biotechnologiques, comme les essais de toxicité aiguë (voir chapitre 6), qui nécessitent des quantités relativement importantes de matériel, sont souvent irréalisables si l'on utilise la protéine purifiée d'un tissu végétal. Ces études utilisent normalement plutôt des protéines purifiées provenant de systèmes d'expression bactérienne. Il est alors nécessaire de démontrer l'équivalence fonctionnelle (c'est-à-dire l'équivalence des propriétés biochimiques et des activités biologiques) des protéines purifiées provenant des deux sources¹².

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 32. Des informations devraient être fournies sur toutes les substances exprimées dans la plante à ADN recombiné, ces informations devraient inclure:

- A) le(s) produit(s) du gène (une protéine ou un ARN non traduit);
- B) la fonction du ou des produit(s) du gène;
- C) la description phénotypique du ou des nouveaux caractères(s);
- D) le niveau et le site d'expression dans la plante du ou des produit(s) du gène exprimé et les niveaux de ses métabolites dans la plante, particulièrement dans les parties comestibles; et
- E) lorsque c'est possible, la quantité du ou des produits du gène cible si la fonction de(s) séquence(s)/gène(s) exprimés est d'altérer l'accumulation d'un ARNm ou d'une protéine endogène spécifique.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 33. De plus, des informations devraient être fournies:

- A) pour démontrer si l'arrangement du matériel génétique utilisé pour l'insertion a bien été conservé ou si des réarrangements importants sont intervenus pendant l'intégration;
- B) pour démontrer si les modifications délibérées faites à la séquence des acides aminés de la protéine exprimée résultent en des changements dans ses modifications post-traductionnelles ou affectent des sites critiques pour sa structure ou sa fonction;
- C) pour démontrer si l'effet escompté de la modification a bien été obtenu et que tous les caractères exprimés sont exprimés et hérités d'une manière stable après plusieurs générations et qui soit en accord avec les lois de l'hérédité. Il peut s'avérer nécessaire d'examiner le caractère héréditaire du transgène lui-même ou l'expression de l'ARN correspondant au cas où les caractéristiques phénotypiques ne peuvent être observées directement;
- D) pour démontrer si les nouveaux caractère(s) exprimés sont exprimés comme prévu dans les tissus appropriés, d'une manière et à des niveaux cohérents avec les séquences régulatrices associées qui contrôlent l'expression du gène correspondant;
- E) pour indiquer s'il existe une quelconque preuve qui suggère qu'un ou plusieurs gènes de la plante hôte a (ont) été affecté(s) par le processus de transformation; et
- F) pour confirmer l'identité et le profil d'expression de toutes nouvelles protéines fusion.

¹¹ Cas de la tomate FlavSavr™, qui contient une séquence anti-sens correspondant au gène codant la polygalacturonase.

¹² Lorsque cette équivalence est établie sur la base de l'activité sérologique croisée entre la plante et les protéines bactériennes, il est important d'utiliser des antisérums (polyclonaux ou monoclonaux) dont la spécificité est bien caractérisée.

Le profil d'expression escompté et la stabilité de l'hérédité de chaque trait introduit sont habituellement démontrés au moyen de données provenant d'essais en champs recueillis pendant plusieurs saisons, dans des zones géographiques différentes. En général, la stabilité du génome de l'insert est démontrée en analysant, par transfert Southern, l'ADN extrait d'échantillons de matériel végétal prélevés durant plusieurs saisons et dans divers endroits. De même, la stabilité de l'expression de l'ADN inséré est démontrée par une technique de quantification de la protéine correspondante ou de son activité.

Les techniques modernes de profilage, comme la technologie de microréseau ADN/ARN, (ou les biopuces à ADN/ARN), la protéomique, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CPG-SM) ou la chromatographie en phase liquide couplée à la résonance magnétique nucléaire (CPL-RMN) offrent des possibilités d'élargir les connaissances disponibles pour l'évaluation de la sécurité sanitaire. Des méthodes sensibles de profilage peuvent dépister des changements mineurs ou majeurs au niveau du génome (expression de l'ARNm ou de la production de protéines), et/ou des voies métaboliques. Ces approches générales, non-ciblées, entre lesquelles on peut choisir sans avoir une connaissance préalable des modifications supposées des concentrations de constituants spécifiques de la plante, pourraient être particulièrement intéressantes pour les aliments dérivés de plantes génétiquement modifiées par l'insertion de gènes multiples, comme les plantes ayant des caractéristiques favorables pour la nutrition ou la santé (voir aussi le Chapitre 8 sur l'Évaluation des métabolites).

Il reste à démontrer l'utilité et l'applicabilité de ces techniques non-ciblées pour obtenir des données pour les évaluations des risques, en particulier pour établir et valider la pertinence des changements observés du point de vue de la sécurité sanitaire des aliments. En effet, les différences observées avec ces techniques ne sont pas toujours faciles à distinguer des variations naturelles de la composition biochimique (fluctuations des niveaux de base de plusieurs milliers de variables) dues aux propriétés des différentes variétés, au stade de développement de la plante et à son état de santé, ainsi qu'aux influences de l'environnement et aux changements des conditions de végétation. Les méthodes de profilage ne sont pas encore adaptées pour les évaluations courantes des risques, car les variations observées des profils ne peuvent pas être systématiquement corrélées à des considérations de biosécurité spécifiques. La description des fourchettes des niveaux de base, de la réduction des coûts et de l'élaboration et de la validation des méthodes doit être mieux précisée.

Événements de transformation des plantes générés de manière aléatoire

Généralement, le transgène est intégré dans le(s) chromosome(s) hôte(s) à l'issue de processus de transformation tels que le transfert au moyen d'*Agrobacterium* ou les méthodes biolistiques (bombardement au moyen de micro-projectiles). Certaines insertions ont lieu dans des régions du génome de la plante qui ne sont impliquées dans aucune fonction évidente. Le transgène peut alors exprimer la nouvelle protéine comme prévu sans entraîner de modifications non intentionnelles d'autres caractères de la plante.

Lorsque l'insertion aléatoire se fait dans une région du génome impliquée dans la régulation et la transcription des gènes ou dans la production de protéines, elle peut faire apparaître des phénotypes non recherchés de la plante. Chaque plante récupérée après le processus de transformation, qui porte l'ADN intégré, représente un «événement» transgénique unique.

Comme l'insertion du transgène dans le génome de la plante hôte se fait sur une base aléatoire, on commence en général par produire un grand nombre de végétaux transformés, chacun d'eux contenant une ou plusieurs copies du transgène. Par la suite, des cultures à petite échelle et un criblage sont effectués pour rejeter les phénotypes non recherchés qui possèdent

des caractères indésirables et/ou les «événements» d'insertion de copies multiples, et conserver les phénotypes les plus appropriés pour les soumettre à une caractérisation plus poussée et à d'autres cycles de sélection pour obtenir des cultivars d'élite.

Détection de transgènes à l'aide d'amorces spécifiques à un événement

La présence des transgènes est généralement détectée à l'aide d'une technique d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) utilisant deux amorces d'ADN (d'une longueur de 20 à 30 bases chacune) avec des séquences de nucléotides complémentaires de l'ADN inséré dans la plante génétiquement modifiée. Si les amorces de la PCR sont toutes les deux complémentaires de la séquence du transgène, toutes les variétés et les espèces de la plante qui portent le même transgène montreront le produit de la PCR, quel que soit le lieu de l'insertion dans le génome de la plante. On peut cependant faire une distinction entre les différents «événements» d'insertion du même transgène dans le même cultivar, en sélectionnant la paire d'amorces appropriée.

Le caractère spécifique à un événement est garanti par le choix d'une paire d'amorces dont l'une est complémentaire de la région du génome de la plante adjacente au point d'insertion du transgène, et l'autre est complémentaire d'une région à l'intérieur du transgène. Ces amorces sont dites «spécifiques à un événement». Cette paire d'amorces n'amplifiera qu'un «événement» d'insertion déterminé car le processus d'insertion d'ADN dans les plantes est effectivement aléatoire. De ce fait, chaque insertion d'ADN se fera au hasard dans le génome de la plante et aura des régions flanquantes uniques de l'ADN de la plante.

Il est indispensable d'utiliser des amorces spécifiques à un événement pour différencier un événement de transformation particulier d'autres événements portant le même gène dans la même variété hôte ou dans d'autres variétés de la même espèce de plante cultivée. Les informations sur la séquence pour les régions flanquantes du site d'intégration de l'ADN inséré doivent donc être accessibles pour que les organismes de réglementation puissent conduire une surveillance spécifique à un événement de recombinaison de l'ADN des plantes. Comme il existe d'innombrables cultivars qui contiennent le même transgène, la surveillance des plantes à ADN recombiné se fait habituellement en deux étapes. La première, basée sur une PCR, détermine la présence de transgènes construits fréquemment utilisés. Si le résultat est positif, une seconde étape (également basée sur une PCR) est réalisée à l'aide d'amorces spécifiques à un événement.

Pour des exemples d'utilisation d'amorces spécifiques à un événement, on peut se référer aux méthodes validées publiées en ligne par le Centre commun de recherche de la Commission européenne (JRC): <http://gmo-crl.jrc.it/default.htm>

Degré de finesse des technologies actuelles

L'insertion aléatoire de séquences d'ADN dans le génome de la plante peut avoir des effets non intentionnels, qui peuvent être à l'origine de modifications de l'expression des gènes existants ou de l'activation de gènes silencieux. Il peut en résulter un niveau élevé de toxines natives ou nouvelles dans l'aliment. L'apparition d'effets involontaires n'est pas limitée à l'usage des techniques de recombinaison de l'ADN des plantes, car ce phénomène peut aussi se produire avec les méthodes de sélection classiques. En général les sélectionneurs effectuent des rétrocroisements et une sélection fondée sur la morphologie, le rendement, la qualité des cultures, la résistance aux insectes et aux maladies, etc. au cours desquels ils identifient des lignées qui possèdent des caractères indésirables et sont rejetées¹³. De même, lors de la mise au point de plantes à ADN recombiné, les lignées modifiées qui ne sont pas conformes aux conditions agronomiques, sécuritaires et qualitatives attendues sont

¹³ Les notifications d'effets non intentionnels pouvant avoir une incidence sur la santé humaine sont rares. Il peut s'agir par exemple de faibles rendements pour l'orge et le maïs, d'une teneur élevée en furocoumarines dans le cas du céleri et en glyco-alcaloïdes dans le cas de la pomme de terre.

écartées, ce qui conduit à éliminer des cultures tissulaires ou du processus d'insertion d'ADN de nombreux effets non-intentionnels¹⁴.

L'incapacité de diriger l'insert d'ADN (le transgène) vers un locus spécifique du génome limite les possibilités d'application de la technologie de recombinaison de l'ADN chez les végétaux. Des avancées ultérieures de cette technologie offrant la possibilité de cibler l'insertion d'ADN dans des régions précises du génome pourraient éliminer certains effets non intentionnels, comme les effets de position, sur l'expression du transgène et l'influence de l'insert sur l'expression du génome de la plante ●

¹⁴ Des effets non intentionnels ont été observés dans des plantes à ADN recombiné, comme la pomme de terre (tissu tuberculaire anormal ou faible teneur en glyco-alcaloïdes), le soja (teneur accrue en lignine) et le riz (teneur accrue en vitamine B6 ou en certains dérivés de caroténoïde).