

4. Cadre de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné

Introduction

Depuis le début des années 1990, les plantes à ADN recombiné destinées à un usage alimentaire sont soumises à des procédures d'évaluation de la sécurité sanitaire, conformément aux différents systèmes de réglementation nationaux. Les cadres utilisés pour structurer ces évaluations ont été continuellement améliorés par les organisations internationales et les organes normatifs internationaux afin de garantir l'innocuité des produits et de promouvoir le commerce dans le cadre de réglementations harmonisées. Le concept de l'équivalence substantielle a été introduit par l'OCDE en 1993 en tant qu'outil permettant de structurer l'évaluation de la sécurité sanitaire des plantes à ADN recombiné (OCDE, 1993). Par la suite adopté par l'OMS et la FAO, comme point de départ utile pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des plantes à ADN recombiné, le concept est aujourd'hui un élément essentiel de tous les cadres de réglementation adoptés dans le monde. Il trouve sa justification dans le fait que les plantes à ADN recombiné développées à des fins alimentaires sont considérées comme étant équivalentes en substance (sur le plan chimique) à leur produit traditionnel de référence, mises à part les quelques modifications bien définies qui ont été introduites.

Il n'est donc pas nécessaire de procéder à une caractérisation biologique générale et à des tests toxicologiques approfondis puisque l'approche comparative est censée révéler les différences biologiques significatives. L'évaluation de la sécurité sanitaire des plantes à ADN recombiné destinées à l'alimentation se fonde cependant souvent sur des données complémentaires à large spectre sur les propriétés immunologiques et toxicologiques de la nouvelle variété végétale. Le cadre actuel de l'évaluation de la sécurité sanitaire repose donc à la fois sur l'approche comparative structurée ancrée dans le concept d'équivalence substantielle et sur des analyses complémentaires des propriétés toxicologiques et immunologiques des effets recherchés et des effets non intentionnels potentiels des modifications génétiques introduites. L'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné a pour objet d'examiner les conséquences recherchées et inattendues de la modification considérée sur les composants de l'aliment et d'établir un niveau de sécurité comparatif par rapport au produit traditionnel de référence ayant un historique d'utilisation sans risque.

Le cadre du Codex pour l'évaluation de la sécurité sanitaire

La *Directive régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné*, qui se fonde sur les *Principes pour l'analyse des risques liés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes* (2003) du Codex a été introduite en 2003. Cet outil de formation présente de façon détaillée la conduite d'une évaluation de la sécurité sanitaire des AGM selon le cadre établi par le Codex (CAC/GL45-2003). L'approche par étape de l'évaluation de la sécurité sanitaire est décrite aux paragraphes 18 à 21 de la Directive du Codex.



DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 18. L'évaluation de la sécurité sanitaire d'un aliment dérivé d'une plante à ADN recombiné suit un processus par étape au cours duquel sont examinés les facteurs importants suivants:

- A) la description de la plante à ADN recombiné;
- B) la description de la plante hôte et de son utilisation comme aliment;
- C) la description du ou des organisme(s) donneur(s);
- D) la description de la ou des modification(s) génétique(s);
- E) la caractérisation de la ou des modification(s) génétique(s);
- F) l'évaluation de la sécurité sanitaire;
 - a) substances exprimées (substances autres qu'acides nucléiques);
 - b) analyses de composition en constituants essentiels;
 - c) évaluation des métabolites;
 - d) procédés de transformation de l'aliment;
 - e) modifications nutritionnelles; et
- G) les autres considérations.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 19. Dans certains cas, les caractéristiques du produit peuvent nécessiter la recherche de données et d'informations additionnelles pour aborder des questions particulières au produit en question.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 20. Les expériences destinées à l'obtention de données pour les évaluations de sécurité devraient être conçues et conduites en accord avec des concepts et principes scientifiques solides ainsi que, le cas échéant, de Bonnes pratiques de laboratoire. Les données primaires devraient être fournies aux autorités réglementaires sur demande. Les données devraient être obtenues avec des méthodes scientifiques solides, et analysées avec les méthodes statistiques appropriées. La sensibilité de chaque méthode d'analyse devrait être documentée.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 21. Le but de chaque évaluation de la sécurité sanitaire est de fournir la garantie, à la lumière des connaissances scientifiques les plus récentes, que l'aliment n'aura pas d'effets nocifs quand il est préparé, utilisé et/ou consommé selon son usage prévu. L'objectif souhaité de ce type d'évaluation devrait être de déterminer si le nouvel aliment est aussi sûr et nutritif que le produit traditionnel de référence en prenant en compte l'impact sur le régime alimentaire de tous les changements dans le contenu nutritionnel ou la valeur nutritionnelle. Par essence, l'objectif du processus d'évaluation de la sécurité est donc de définir le produit à l'étude de manière à ce que les gestionnaires des risques puissent déterminer si des mesures doivent être appliquées et, dans l'affirmative, prendre à cet égard des décisions éclairées et appropriées.

Les données spécifiques nécessaires pour décrire les caractéristiques des plantes à ADN recombiné sont précisées dans les paragraphes 22 et 23 de la Directive du Codex et expliquées plus en détail dans les passages qui suivent.

Description de la plante à ADN recombiné

La création d'une plante à ADN recombiné résulte d'un transfert de gène réussi (transformation) suivi d'une intégration stable de l'ADN recombiné (transgène) dans le ou les chromosome(s) nucléaire(s) ou dans le(s) génome(s) d'organelles de la plante. Les biotechnologistes utilisent des techniques de sélection végétale classiques comme l'auto-fécondation pour former cette plante homozygote initiale au(x) locus (loci) recombinants. L'ADN recombiné peut alors se transférer de manière stable de génération en génération sans ségrégation. Le nom de la descendance d'une telle plante à ADN recombiné est aussi défini par la plante à ADN recombiné initiale de référence. Chaque lignée végétale issue d'un transfert réussi, d'une régénération et d'une propagation de la plante est appelée «événement» ou «cas».

Il est important que l'évaluateur de la sécurité ait une bonne connaissance de la plante à ADN recombiné qu'il doit analyser. Ainsi, il est indispensable qu'il comprenne bien le terme «événement» pour appliquer une évaluation de la sécurité sanitaire «au cas par cas». Comme chaque «événement» représente un site (ou des sites) d'insertion unique de l'ADN recombiné (transgène), les propriétés phénotypiques des plantes recombinées régénérées qui en résultent peuvent être différentes. Ainsi, alors que les différents «événements» d'insertion ne modifieront pas les propriétés biologiques générales de la plante à ADN recombiné, les effets involontaires potentiels sur le génome hôte peuvent varier, puisque les conséquences des insertions peuvent varier suivant leur lieu et leur nombre (voir encart 4.1 ci-après). Un «événement» peut représenter une plante avec un seul insert ou avec plusieurs inserts transférés simultanément. Par exemple, un événement unique peut comprendre plusieurs insertions d'ADN recombiné codant à la fois la résistance aux insecticides et la résistance aux herbicides, si ces caractères ont été transférés simultanément.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE

22. Une description de la plante à ADN recombiné présentée pour l'évaluation de la sécurité sanitaire devrait être fournie. Cette description devrait identifier l'espèce cultivée, le ou les événement(s) de transformation à examiner ainsi que le type et le but de la modification et son objectif. Cette description devrait être suffisamment détaillée pour aider à comprendre la nature de l'aliment soumis à l'évaluation de la sécurité.

Les plantes qui contiennent de l'ADN recombiné provenant d'événements de transfert indépendants ont des caractères "empilés", et sont souvent issues de croisements de cultivars dont chacun est porteur d'« événements » uniques et bien caractérisés. Il s'ensuit que plusieurs insertions d'ADN (et "événements") sélectionnées sur la base de leur bonne performance dans leur hôte récepteur initial peuvent être rassemblées dans une nouvelle variété végétale. Dans le cas de plantes ayant des insertions d'ADN recombiné (transgènes) empilées, l'évaluation de la sécurité sanitaire doit aussi identifier les interactions potentielles entre les insertions d'ADN.

Les deux ou trois premières pages des extraits du dossier type fourni avec le présent outil contiennent des descriptions pertinentes destinées à donner à l'évaluateur de la sécurité des informations sur les caractéristiques clés et l'objectif recherché de la manipulation génétique.

Description de la plante hôte et de son utilisation comme aliment

Les paragraphes 23 à 25 indiquent les informations qui doivent être fournies sur la plante hôte et sur ses utilisations alimentaires connues. Une connaissance approfondie de la plante hôte non

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 23. Une description détaillée de la plante hôte devrait être fournie. Les données et informations nécessaires devraient comprendre, mais sans nécessairement s'y limiter:

- A) le nom commun et usuel; le nom scientifique ; et la classification taxonomique;
- B) un historique de la culture et du développement à travers la sélection, en particulier, en identifiant les caractères qui peuvent avoir un impact néfaste sur la santé humaine;
- C) des informations sur les génotype et phénotype de la plante hôte concernant sa sécurité, incluant tout toxicité ou pouvoir allergisant connus; et
- D) un historique d'une utilisation sûre pour la consommation en tant qu'aliment.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 24. Les informations phénotypiques pertinentes devraient être fournies non seulement pour la plante hôte, mais aussi pour les espèces proches et pour les plantes qui ont contribué ou qui ont pu contribuer significativement à son patrimoine génétique.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 25. L'historique d'utilisation peut inclure des informations sur la façon dont la plante est classiquement cultivée, transportée et stockée, si des procédés particuliers sont nécessaires pour rendre la plante saine à la consommation, et le rôle habituel que joue la plante dans le régime alimentaire (ex: quelle partie de la plante est utilisée comme source alimentaire, si sa consommation est importante dans certains sous-groupes de la population, quels macro- ou microéléments nutritifs importants elle fournit au régime alimentaire).

modifiée est nécessaire pour appliquer le concept d'équivalence substantielle comme point de départ pour établir la sécurité sanitaire. Dans le cas de la sécurité sanitaire des aliments, cette connaissance descriptive est cruciale pour identifier la gamme et la variation naturelles des composants nutritionnels essentiels, ainsi que des substances toxiques connues (par exemple, alcaloïdes dans les pommes de terre et les tomates et cucurbitacines dans les courges et les courgettes), des facteurs antinutritionnels et des allergènes potentiels. Ces composés et leurs concentrations respectives varient selon les plantes cultivées, les cultivars et les conditions de croissance, de la même manière que ceux des variétés traditionnelles.

Les variations naturelles de ces composés correspondent au «niveau de base». On s'efforce actuellement de constituer des bases de données contenant des descriptions de la fourchette des niveaux de base des composants chimiques essentiels naturellement présents dans les plantes cultivées. Ces plantes contiennent naturellement plusieurs milliers de composants chimiques, dont un grand nombre peuvent avoir des effets indésirables dans les tests toxicologiques s'ils sont extraits individuellement et administrés à fortes doses à des animaux de laboratoire. Il est donc difficile d'évaluer les effets biologiques qui pourraient résulter de variations ou de

fluctuations mineures des concentrations d'un composant spécifique de la plante. D'où l'importance de connaître la variation naturelle du niveau de base des composants essentiels des variétés traditionnelles de la plante pour évaluer la sécurité sanitaire d'ensembles de données complexes obtenues par une analyse chimique des plantes à ADN recombiné.

Les procédés de transformation après récolte de la plante peuvent aussi altérer les niveaux de certains de ses composants qui ont une valeur nutritionnelle. Il est donc

indispensable d'avoir des renseignements sur l'utilisation, la transformation et la consommation et de connaître les propriétés du produit final de la culture vivrière traditionnelle pour pouvoir effectuer une comparaison appropriée avec les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné, sur une base solide. Ces informations sont fournies dans les documents/dossiers types.

Les documents de consensus de l'OCDE constituent une source d'informations approfondies sur la biologie des plantes-hôte. Ils contiennent des informations techniques à utiliser durant l'évaluation réglementaire des produits issus des biotechnologies. Ils portent sur la biologie des organismes (tels que plantes, arbres ou micro-organismes) ou sur les caractéristiques introduites et sont accessibles à l'adresse: http://www.oecd.org/document/51/0,2340,fr_2649_34385_1889395_1_1_1_1,00.html

Description de l'organisme(s) donneur(s)

Il est nécessaire d'avoir des informations sur l'histoire naturelle de l'organisme donneur relativement aux séquences d'ADN recombiné, surtout si à l'état naturel, le donneur (ou d'autres membres appartenant au même genre) possède des caractéristiques de pathogénicité ou produit des toxines, ou possède d'autres caractères qui affectent la santé humaine. Si l'organisme donneur contient des allergènes connus, on fera preuve d'une prudence particulière. Jusqu'à preuve du contraire, lorsqu'un aliment dérivé de plantes à ADN recombiné contient des gènes provenant de telles sources, on suppose que le nouveau produit du gène est allergène. Comme on le verra dans la section 7, cet aspect est pris en compte dans l'évaluation de l'allergénicité. Dans les cas où l'ADN recombiné provient de sources sans antécédents d'allergénicité, les évaluations de l'allergénicité ou de la toxicité reposent principalement sur des comparaisons des séquences d'acides aminés et sur la stabilité de la nouvelle protéine lors de la digestion et de la transformation (voir sections 6 et 7). On notera que cette dernière comparaison n'est pas faite par rapport au produit traditionnel de référence, mais sur la base de connaissances générales des propriétés biologiques d'allergènes connus présents dans les aliments.

Actuellement, la plupart des séquences d'ADN utilisées à des fins commerciales qui sont insérées dans des plantes à ADN recombiné sont recueillies à partir de bactéries du sol ou de bactéries pathogènes ou de virus des végétaux dont la présence est habituelle, de sorte que leur historique est généralement connu en agriculture. L'établissement d'un historique de l'exposition humaine à la source de l'ADN recombiné est un point de départ utile pour identifier les propriétés toxiques et le pouvoir allergisant éventuels des produits du gène. Il faut néanmoins être prudent lorsque l'on utilise ces informations pour en tirer des inférences sur la sécurité sanitaire, compte tenu des altérations potentielles des niveaux d'expression, des sites cellulaires et des voies d'exposition des protéines issues d'ADN recombiné. Les documents/dossiers types contiennent des informations sur les organismes donneurs.

Les documents de consensus de l'OCDE fournissent également des informations sur la biologie des organismes donneurs de gènes: http://www.oecd.org/document/51/0,2340,en_2649_34385_1889395_1_1_1_1,00.html

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 26. Des informations devraient être fournies sur le ou les organisme(s) donneur(s) et, le cas échéant, sur d'autres espèces apparentées. Il est particulièrement important de déterminer si le ou les organisme(s) donneur(s) ou d'autres membres apparentés de la famille taxonomique montrent naturellement des caractéristiques pathogènes ou, produisent des toxines, ou ont d'autres caractères affectant la santé humaine (ex: présence de facteurs antinutritionnels). La description du ou des organisme(s) donneur(s) devrait inclure:

- A) son(ses) nom(s) usuel(s) ou courant(s);
- B) le nom scientifique;
- C) la classification taxonomique;
- D) des informations sur son histoire naturelle en ce qui concerne la sécurité sanitaire de l'aliment ;
- E) des informations sur les toxines, les allergènes et les facteurs antinutritionnels survenant naturellement; pour les micro organismes, des informations complémentaires sur la pathogénicité et les relations avec des pathogènes connus; et
- F) des informations sur des usages passés et présents, dans l'approvisionnement alimentaire et de voie(s) d'exposition autres que l'usage alimentaire prévu (ex: présence éventuelle en tant que contaminant).

Description de la ou des modification(s) génétique(s)

Les données concernant les modifications génétiques doivent être fournies dans un double but:

- i) permettre une compréhension détaillée du matériel génétique inséré et des sites d'insertion dans l'organisme de la plante hôte ; ii) faciliter l'établissement pour l'événement considéré d'identificateurs uniques sur la base des sites d'insertion de l'ADN recombiné dans le génome de la plante hôte. Cette dernière information peut être importante d'une part pour garantir à l'obteneur l'utilisation et la distribution commerciales de la plante à ADN recombiné, et d'autre part pour permettre aux pays

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 27. Des informations suffisantes devraient être fournies au sujet de la modification génétique pour permettre l'identification de tout le matériel génétique potentiellement délivré à la plante hôte et pour fournir les informations nécessaires à l'analyse des données pour étayer la caractérisation de l'ADN inséré dans la plante.

soumis à des obligations d'étiquetage des denrées alimentaires, d'organiser pour l'événement considéré, le suivi de l'ADN recombiné dans la chaîne alimentaire. Pour évaluer la sécurité biologique, il est important de disposer d'informations sur le nombre et les sites d'insertions afin d'évaluer les effets de ces insertions sur le génome de la plante hôte et de prédire les changements phénotypiques potentiels. Une description détaillée des caractéristiques moléculaires de la plante à ADN recombiné est nécessaire pour prouver que l'obteneur a effectué une analyse critique de la plante et de ses produits, notamment de tous les gènes introduits et de toutes les protéines exprimées. On notera que les plantes à ADN recombiné ont fait l'objet d'une sélection approfondie après l'événement initial de transfert de gène et avant la demande de l'autorisation réglementaire. Ainsi, l'obteneur fournira vraisemblablement toute une série de données dans son dossier de demande d'autorisation, pour démontrer que la plante à ADN recombiné n'exprime que les changements phénotypiques recherchés. Comme le montrent les documents/dossiers types, la caractérisation des modifications génétiques est largement documentée.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 28. La description du processus de transformation devrait inclure:

- A) des informations sur la méthode utilisée pour la transformation (ex: transformation au moyen d'*Agrobacterium*);
- B) si cela est applicable, des informations sur l'ADN utilisé pour modifier la plante (ex: plasmides assistants), en incluant sa source (végétale, microbienne, virale, synthétique), son identité et ses fonctions attendues dans la plante; et
- C) des organismes hôtes intermédiaires, y compris les organismes (ex: bactéries) utilisés pour produire ou modifier l'ADN qui a servi à la transformation de l'organisme hôte.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 29. Des informations devraient être fournies sur l'ADN introduit, incluant:

- A) la caractérisation de tous les composants génétiques, comprenant les gènes marqueurs, les éléments régulateurs et les autres éléments affectant la fonction de l'ADN;
- B) la taille et l'identité;
- C) la localisation et l'orientation des séquences dans le vecteur/construction final(e); et
- D) la fonction.

La méthode employée pour introduire les nouveaux caractères dans la plante hôte détermine, en partie, les informations à fournir pour l'évaluation de la sécurité sanitaire axée sur les propriétés génétiques de la plante. Les deux principales méthodes adoptées pour introduire du nouveau matériel génétique dans des cellules végétales sont i) la transformation au moyen d'*Agrobacterium* et ii) le bombardement au moyen de microparticules.

i) Transfert de gène au moyen d'*Agrobacterium*.

Agrobacterium tumefaciens est un agent phytopathogène du sol qui utilise des processus de recombinaison génétique pour destabiliser le métabolisme des cellules du végétal hôte. De cette manière, il détourne une partie de l'apport en carbone et en azote organiques de l'hôte pour produire des nutriments (opines) qui peuvent être spécifiquement

catabolisés par la bactérie envahissante. Il stimule aussi la prolifération des cellules parasitées. La tumeur de la galle du collet résulte directement de l'incorporation d'une région de l'ADN de transfert (ADN-T) provenant d'un plasmide circulaire de grande taille (150-250 kB), le plasmide Ti (à action oncogène), transporté par *A. tumefaciens* dans le génome du végétal hôte. C'est la compréhension de ce processus naturel de transformation et du fait que tout ADN étranger placé entre les séquences d'ADN-T de bordure pouvait être transféré dans les cellules végétales qui a conduit à la construction du premier vecteur et des premiers systèmes de souches

Encart 4.1. Aspects mécaniques du processus de transformation, présentant un intérêt pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des plantes à ADN recombiné

Longueur et nombre de copies d'ADN transféré.

Jusqu'en 1995, on supposait que, dans les transferts de gènes par *Agrobacterium*, les séquences comprises entre les extrémités gauche et droite de l'ADN-T étaient les seuls éléments transgéniques transférés dans l'hôte receveur. Ramanathan et Veluthambi (1995), Wenk *et al.* (1997) et Kononov *et al.* (1997) ont tous montré que les séquences du squelette plasmidique au-delà des extrémités de l'ADN-T pouvaient également être intégrées avec les gènes considérés. Des expériences menées par Kononov *et al.* (1997) ont démontré que les séquences du squelette plasmidique pouvaient être intégrées dans le génome hôte accompagnées des séquences de l'extrémité droite ou gauche ou en tant qu'unité indépendante non liée à l'ADN-T. L'ADN-T peut aussi s'intégrer dans le génome hôte selon des configurations autres qu'une copie unique en un seul site. Plusieurs copies de séquences répétées directes ou inverses ainsi que d'autres configurations complexes peuvent également se rencontrer. La présence d'inserts de multimères d'ADN-T, notamment de structures répétées inverses, est fortement associée au phénomène de mise sous silence du transgène (voir plus loin) (Gelvin, 1998).

Dans un transfert de gène par bombardement de microparticules, les modèles d'intégration du transgène peuvent mettre en évidence: le transgène pleine longueur introduit, des réarrangements transgéniques dont la taille est différente de celle de l'insert pleine longueur, un enchaînement occasionnel de plasmides introduits portant le transgène et une variation du nombre de copies entre les éléments transgéniques pleine longueur et les éléments transgéniques partiels. (Pawlowski et Somers, 1996). Le nombre de copies de transgènes peut varier de 1 à 20 ou plus s'ajoutant à l'insertion de fragments partiels du transgène. Les copies multiples se séparent normalement les unes des autres sous forme de locus de transgènes, indiquant ainsi que les séquences s'intègrent dans des locus étroitement reliés ou dans un locus unique et non pas de façon aléatoire dans tous les chromosomes (Pawlowski et Somers, 1996). La caractérisation moléculaire des plantes transgéniques produites par bombardement au moyen de microparticules a mis en évi-

dence des réarrangements à grande échelle de séquences de transgènes (Pawlowski et Somers, 1996). Ces réarrangements peuvent être observés lors des analyses par transfert Southern sous la forme des fragments hybrides d'une taille différente de celle de l'insert d'ADN pleine longueur. Des fragments plus grands indiquent un enchaînement (tête à tête ou tête-bêche)⁸. Des fragments plus grands que les fragments d'ADN transgéniques pleine longueur peuvent également être dus à l'intercalation d'inserts dans l'ADN de l'hôte. Pawlowski et Somers (1998) ont indiqué que chacune des 13 lignées d'avoine transgénique transformées par bombardement au moyen de microparticules possédait des copies intactes du transgène, mais aussi de multiples fragments transgéniques réarrangés et/ou tronqués. Le nombre des sites d'insertion variait de 2 à 12 et il y avait une co-ségrégation de tous les fragments d'ADN transgénique. Les auteurs ont établi que l'ADN transgénique était intercalé avec celui de l'hôte. Ce phénomène a également été rapporté pour le riz (Cooley *et al.* 1995).

Variation des niveaux d'expression des gènes selon le site d'insertion.

Quelle que soit la méthode de transfert de gène utilisée, des plantes transformées individuellement avec le même plasmide présentent fréquemment des niveaux d'expression différents, un phénomène qui n'est pas toujours corrélé avec le nombre de copies (Gelvin, 1998). Certains ont plutôt attribué l'expression différentielle des transgènes à des «effets de position» selon lesquels la position du site d'intégration de l'ADN dans le génome hôte affecte le niveau de l'expression des transgènes. Cependant, d'autres chercheurs ont montré que des facteurs supplémentaires ou autres que la position du site d'intégration contribuent au niveau de l'expression des transgènes (Gelvin, 1998). C'est notamment le cas des arrangements variables que peuvent prendre les séquences transgéniques dans le génome hôte. L'expression variable des transgènes, ou la mise sous silence des gènes,⁹ est un phénomène bien documenté chez les plantes transgéniques.

bactériennes destinés à la transformation des végétaux (pour une étude complète, voir Hooykaas et Shilperoort, 1992). Depuis le premier enregistrement de gènes étrangers codant un plant de tabac transgénique, de gros progrès ont été réalisés dans la connaissance du transfert de gènes par *Agrobacterium* au niveau moléculaire. *A. tumefaciens* infecte naturellement uniquement les dicotylédones mais des méthodes de transfert de gènes, par *Agrobacterium*, dans les monocotylédones ont maintenant été mises au point pour le riz (Hiei *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1998), la banane (May *et al.*, 1995), le maïs (Ishida *et al.*, 1996), le blé tendre (Cheng *et al.*, 1997) et la canne à sucre (Arenicibia *et al.*, 1998 ; Enríquez-Obregón, 1998). Une analyse approfondie des stratégies d'application pratique de cette méthodologie a été publiée (Birch, 1997). La transformation par *Agrobacterium* de tissus végétaux entraîne généralement un nombre peu élevé de copies du transgène, des réarrangements minimes et une plus grande

⁸ Des concatémères de l'insert d'ADN peuvent être déduits par digestion de l'ADN génomique avec une enzyme de restriction qui coupe au niveau d'un site unique de l'élément transgénique ; les copies multiples de l'insert d'ADN sont alors résolues par une analyse par transfert Southern. Des concatémères peuvent être formés par recombinaison homologue de l'ADN transformé ou par ligation des bouts francs des extrémités cohésives produites par l'activité limitée de l'exonucléase. Des fragments plus petits que les fragments pleine longueur sont la preuve de phénomènes de délétions et de troncatures.

⁹ La mise sous silence d'un gène peut résulter d'interactions entre plusieurs copies des transgènes et les gènes endogènes associés ; elle est liée à des mécanismes reposant sur l'homologie qui agissent au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel (Matzke et Matzke, 1998). La mise sous silence qui

résulte d'une anomalie au moment de l'initiation de la transcription est souvent associée à la méthylation de la cytosine et/ou à la condensation de la chromatine (Fagard et Vaucheret, 2000), tandis que la mise sous silence post-transcriptionnelle (co-suppression) entraîne un meilleur renouvellement de l'ARN dans le cytoplasme (Matzke et Matzke, 1998). Une troisième catégorie de mise sous silence a également été proposée pour expliquer les conséquences des effets de position lorsque l'ADN des végétaux avoisinants et/ou la localisation chromosomale défavorable ont cet effet sur le transgène (Matzke et Matzke, 1998). Selon Matzke et Matzke (1998), ce type de mise sous silence reflète l'état épigénétique des séquences de l'hôte voisines du site d'insertion ou la tolérance de régions chromosomales particulières à l'insertion d'ADN étranger.

efficacité de la transformation que les techniques de libération directe d'ADN telles que le bombardement au moyen de microprojectiles (Pawlowski et Somers, 1996; Gelvin, 1998).

ii) Transfert de gène par bombardement au moyen de microprojectiles.

Le bombardement au moyen de microprojectiles (également appelé bombardement au moyen de microparticules ou transformation biolistique) est une technique utilisée pour libérer l'ADN directement dans le génome hôte, qui s'est révélée utile pour la transformation de tissus végétaux récalcitrants à l'infection par *Agrobacterium*. En résumé, un plasmide ou de l'ADN linéarisé contenant le(s) gène(s) concerné(s) est fixé à des particules de tungstène ou d'or (billes micro-porteuses) qui sont libérées dans les cellules de l'hôte à haute vitesse de manière à pénétrer les cellules végétales. Dans la cellule, l'ADN peut se séparer de la bille micro-porteuse et s'intégrer dans le génome hôte. Le bombardement au moyen de microprojectiles peut être utilisé pour transformer le tissu de la plupart des espèces végétales, tant que les tissus végétaux transformés peuvent être régénérés pour produire des plantes entières. Comme on le voit dans les documents/dossiers types, les détails concernant la technique de transfert de gène utilisée et l'analyse moléculaire de l'insertion d'ADN qui en résulte sont indiqués dans toute demande d'autorisation/notification réglementaire.

Pour préserver la confidentialité des informations commerciales, les dossiers de demande contiennent rarement des informations précises et détaillées sur les techniques et les pratiques de laboratoire utilisées dans les protocoles de transfert d'ADN recombiné. Quelques aspects mécaniques généraux du processus de transformation utiles pour l'évaluation de la salubrité des plantes à ADN recombiné sont décrits plus en détail dans l'encart 4.1.

Références

- Arencibia, A.D., Carmona, E.R., Tellez, P., Chan, M.T., Yu, S.M., Trujillo, L.E., & Oramas, P. 1998. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Res.* 7: 1–10.
- Birch, R.G. 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 297–326.
- Cheng, M., Fry, J.E., Pang, S.Z., Zhou, H.P., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Conner, W. & Wan, Y.C. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 115: 971–980.
- Cheng, X.Y., Sardana, R., Kaplan, H. & Altosaar, I. 1998. *Agrobacterium*-transformed rice expressing synthetic cry1Ab and cry1Ac genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95: 2767–2772.
- Cooley, J., Ford, T. & Christou, P. 1995. Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plants produced by electric-discharge particle acceleration. *Theor. Appl. Genet.* 90: 97–104.
- Enríquez-Obregón, G.A., Vázquez-Padrón, R.I., Prieto-Sansonov, D.L., de la Riva, G.A. & Selman-Housein, G. 1998. Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Planta* 206: 20–27.
- Fagard, M. & Vaucheret, H. 2000. (Trans)gene silencing in plants: how many mechanisms? *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 167–194.
- Gelvin, S.B. 1998. The introduction and expression of transgenes in plants. *Curr. Opinion Biotechnol.* 9: 227–232.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. & Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6: 271–282.
- Hooykaas, P.J.J. & Schilperoort, R.A. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.* 19: 15–38.

- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. & Kumashiro, T. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol.* 4: 745–750.
- Kononov, M.E., Bassuner, B. & Gelvin, S.B. 1997. Integration of T-DNA binary vector “backbone” sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant J.* 11: 945–957.
- Matzke, A.J.M. & Matzke, M.A. 1998. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr. Opinion Plant Biol.* 1: 142–148.
- May, G.D., Afza, R., Mason, H.S., Wiecko, A., Novak, F.J. & Arntzen, C.J. 1995. Generation of transgenic Banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biotechnol.* 13: 486–492.
- OCDE. 1993. Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology, concepts and principles. Organisation de coopération et de développement économiques.
- Powlowski, W.P. & Somers, D.A. 1996. Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. *Mol. Biotechnol.* 6: 17–30.
- Powlowski, W.P. & Somers, D.A. 1998. Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 12106–12110.
- Ramanathan, V. & Veluthambi, K. 1995. Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of TL-DNA. *Plant Mol. Biol.* 28: 1149–1154.
- Wenck, A., Czako, M., Kanevski, I. & Marton, L. 1997. Frequent colinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol. Biol.* 34: 913–922 ●

