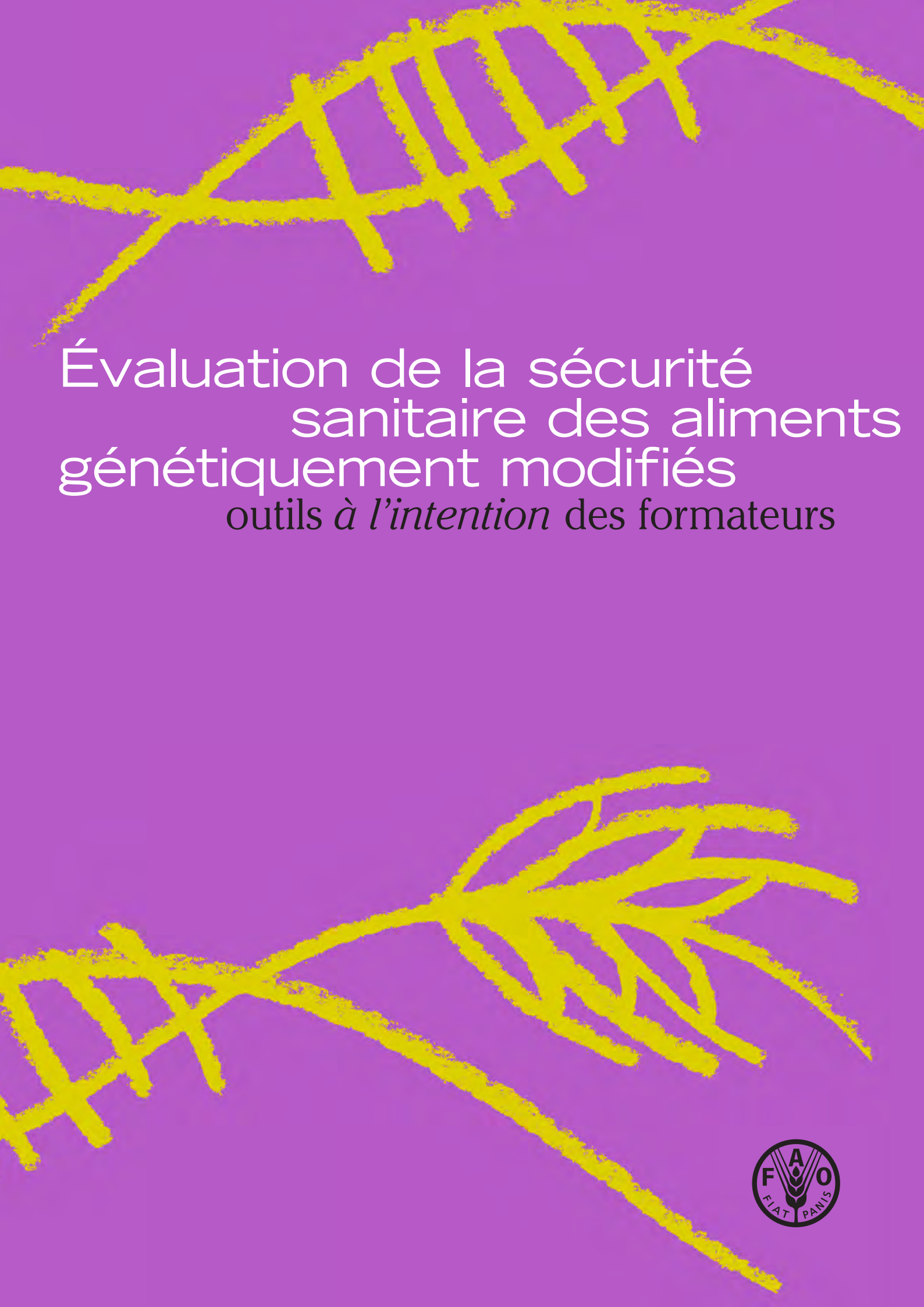
Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments génétiquement modifiés

outils *à l'intention* des formateurs



Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments génétiquement modifiés

outils *à l'intention* des formateurs

Organisation
des Nations Unies
pour l'alimentation
et l'agriculture
Roma, 2009

Les points de vue et opinions présentés n'engagent que leurs auteurs, et ne sauraient être interprétés comme représentant ceux de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). Les appellations employées dans ce produit d'information et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de la FAO aucune prise de position quant au statut juridique ou au stade de développement des pays, territoires, villes ou zones ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites.

ISBN XXX-XX-X-XXXXXX-X

Tous droits réservés. Les informations contenues dans ce produit d'information peuvent être reproduites ou diffusées à des fins éducatives et non commerciales sans autorisation préalable du détenteur des droits d'auteur à condition que la source des informations soit clairement indiquée. Ces informations ne peuvent toutefois pas être reproduites pour la revente ou d'autres fins commerciales sans l'autorisation écrite du détenteur des droits d'auteur. Les demandes d'autorisation devront être adressées au Chef de la Sous-division des politiques et de l'appui en matière de publications électroniques, Division de la communication, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italie ou par courrier électronique à: copyright@fao.org

© FAO 2009

Pour de plus amples informations, prière de contacter:
Service de la qualité des aliments et des normes alimentaires,
Division de la nutrition et de la protection des consommateurs
Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
Viale delle Terme di Caracalla
00153, Rome, Italie
Fax: (+39) 06 570 54593
Courriel: food-quality@fao.org
Site Web: www.fao.org/ag/agn/agns/

Table des matières

iv Liste des tableaux, encarts, fiches et modules de présentation
v Liste des annexes
v Contenu du CD-ROM
vi Remerciements
vii Avant-propos
x Sigles

1 Partie 1. Principes de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné
3 1. Introduction
5 2. Concepts et principes de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné (dans les cadres de règlementation internationaux)
8 3. L'approche comparative de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné
14 4. Cadre de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné
22 5. Caractérisation de la ou des modification(s) génétique(s)
27 6. Évaluation de la toxicité éventuelle des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné
35 7. Évaluation de l'allergénicité potentielle (protéines) dans les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné
41 8. Analyses de composition en constituants essentiels, évaluation des métabolites, procédés de transformation des aliments et modifications nutritionnelles
47 9. Perspectives pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de la prochaine génération de plantes à ADN recombiné
51 10. Communication sur les risques entre les parties prenantes
59 11. Glossaire des termes, des liens et des ressources
65 Annexes. Documents pertinents du Codex

87 Partie 2. Outils et techniques à l'intention des formateurs
89 12. Préparation et tenue d'un atelier
101 Supports visuels

119 Partie 3. Études de cas
121 Etude de cas 1. Evaluation de la sécurité sanitaire du maïs génétiquement modifié résistant aux insectes - Evènement de transformation MON 810
135 Etude de cas 2. Evaluation de la sécurité sanitaire du soja génétiquement modifié à haute teneur en acide oléique
165 Etude de cas 3. Evaluation de la sécurité sanitaire du soja génétiquement modifié résistant aux herbicides

Liste des tableaux, encarts, fiches et modules de présentation

Tableaux

6 Tableau 2.1. Principales consultations internationales sur l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné (1990-2006)
36 Tableau 7.1. Séquences de protéines allergènes d'origine végétale

Encarts

19 Encart 4.1. Aspects mécaniques du processus de transformation, présentant un intérêt pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des plantes à ADN recombiné
30 Encart 6.1. Nécessité d'études chez l'animal (FAO/OMS, 2000)
30 Encart 6.2. Études toxicologiques sur les aliments issus de la biotechnologie (FAO/OMS, 2000)
31 Encart 6.3. Aspects techniques des études de toxicité subchronique (FDA, 2003)
38 Encart 7.1. Principaux paramètres utilisés dans les évaluations de l'allergénicité
49 Encart 9.1. Le riz doré
49 Encart 9.2. Traits saillants de la prévention des risques biotechnologiques pour les aliments dont les qualités nutritionnelles ont été renforcées
52 Encadré 10.1. La communication sur les risques dans le processus de l'analyse des risques
55 Encadré 10.2. Considérations utiles pour la considération sur les risques
95 Encadré 12.1. Élaborer un ordre du jour efficace
95 Encadré 12.2. Mettre au point l'évaluation d'un atelier

Fiches

90 Fiche 12.1. Cadre de référence pour la sélection des participants
91 Fiche 12.2. Liste récapitulative pour la préparation d'un atelier
92 Fiche 12.3. Modèle d'ordre du jour pour un atelier de 3 jours
96 Fiche 12.4. Modèle de fiche d'évaluation d'un atelier

Modules de présentation

101 Module 1. Aperçu de l'Atelier
103 Module 2. Concepts et principes de l'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM
108 Module 3. L'approche et le cadre de l'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM
111 Module 4. Caractérisation de la ou des modification(s) génétique(s), évaluation de la toxicité et de l'allergénicité potentielles et analyse de la composition
114 Module 5. Communication sur les risques et décisions en matière de sécurité sanitaire

Liste des annexes

66 Annexe 1. Principes pour l'analyse des risques liés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes CAC/GL 44-2003
69 Annexe 2. Directive régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné CAC/GL 45-2003

Contenu du Cd-Rom

Modules de présentation

- Module 1. Aperçu de l'Atelier
- Module 2. Concepts et principes de l'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM
- Module 3. L'approche et le cadre de l'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM
- Module 4. Caractérisation de la ou des modification(s) génétique(s), évaluation de la toxicité et de l'allergénicité potentielles et analyse de la composition
- Module 5. Communication sur les risques et décisions en matière de sécurité sanitaire

Documents du Codex Alimentarius

- Principes pour l'analyse des risques liés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes CAC/GL 44-2003
- Directive régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné CAC/GL 45-2003

Listes et fiches diverses

- Cadre de référence pour la sélection des participants
- Liste récapitulative pour la préparation d'un atelier
- Modèle d'ordre du jour pour un atelier de 3 jours
- Modèle de fiche d'évaluation d'un atelier

Remerciements

La FAO tient à remercier les nombreuses personnes qui ont prodigué des avis et des conseils durant la préparation de la présente publication. Cet outil de formation a été élaboré à l'intention du Service de la qualité des aliments et des normes alimentaires (AGNS) de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). La version originale du document a été rédigée par Morven McLean, titulaire d'un doctorat et consultant international de la FAO, et approfondie par Masami Takeuchi, titulaire d'un doctorat, du service AGNS de la FAO, et Ezzeddine Boutrif, Directeur de la Division de la nutrition et de la protection des consommateurs (AGN). Plusieurs fonctionnaires de l'AGNS et d'autres unités de la FAO ont fait des observations et des suggestions qui nous ont été précieux. Sarah Binns s'est chargée de la correction d'épreuves et de l'édition.

Le Gouvernement canadien, représenté par Santé Canada, a participé activement, en contribuant au projet de document initial et en mettant en pratique la formation lors de l'atelier pilote. La FAO tient à remercier William Yan (Santé Canada), Paul Brent, (Normes alimentaires Australie Nouvelle-Zélande -FSANZ) et Kathleen Jones (United States Food and Drug Administration - US FDA), grâce auxquels le projet de document initial a pu être amélioré avant l'essai pilote de l'outil. Un certain nombre d'experts de la sécurité sanitaire des aliments dérivés des biotechnologies modernes, venus de différentes régions du monde, sont intervenus dans l'essai pilote, qui a eu lieu à Ottawa (Canada) en 2006. La FAO remercie également les experts internationaux qui ont participé à la réunion d'examen final, tenue à Bangkok en 2007, à savoir Behzad Ghareyazie, Sathin Kunawasen, Kelebohile Lekoape, Kaare M. Nielsen, Marilia Nutti, Vinod Prabhu et Ruud Valyasevi, pour l'intérêt et l'engagement dont ils ont fait preuve, ainsi que pour leurs contributions précieuses qui ont considérablement amélioré l'outil. Enfin, la FAO remercie vivement le Gouvernement norvégien, qui a soutenu financièrement l'élaboration et la publication de cet outil de formation dans le cadre du programme de partenariat FAO-Norvège ●

Avant-propos

L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) reconnaît que les biotechnologies constituent un outil important pour le développement durable de l'agriculture, des pêches et des forêts, ainsi que du secteur agro-alimentaire. À condition d'être judicieusement associées à d'autres technologies de production de denrées alimentaires ou de produits et de services agricoles, les biotechnologies pourront, au cours du nouveau millénaire, contribuer dans une large mesure à la satisfaction des besoins d'une population en expansion et toujours plus urbanisée.

Il existe un large éventail de "biotechnologies" utilisant des techniques et susceptibles d'applications différentes. La Convention sur la diversité biologique (CDB) définit les biotechnologies comme suit:

> *«toute application technologique qui utilise des systèmes biologiques, des organismes vivants ou des dérivés de ceux-ci pour réaliser ou modifier des produits ou des procédés à usage spécifique.»*

Interprétée au sens large, la définition de la biotechnologie englobe un grand nombre d'outils et de techniques d'usage courant dans le secteur agro-alimentaire. Interprétée dans un sens plus étroit, la définition couvre des technologies spécifiques, telles que la manipulation et le transfert de gènes, le typage de l'ADN et le clonage de plantes et d'animaux. Pour les aliments issus de l'application de techniques de génie génétique et de la fusion cellulaire d'organismes n'appartenant pas à une même famille taxonomique, la définition de la biotechnologie moderne à retenir pour l'analyse de la sécurité biologique des aliments est celle donnée par le Protocole de Cartagena sur la prévention des risques biotechnologiques et adoptée par la Commission du Codex alimentarius (CAC). Les définitions de la biotechnologie et de la biotechnologie moderne prises comme référence dans ce document figurent dans le Glossaire de l'Outil.

Si de nombreux aspects de la biotechnologie et de ses applications ne suscitent plus guère de controverses, les plantes dérivées de techniques de recombinaison de l'ADN, également appelées organismes génétiquement modifiés (OGM), organismes vivants modifiés (OVM, dans le Protocole de Cartagena de la Convention sur le diversité biologique – CDB), cultures génétiquement modifiées et cultures transgéniques, sont devenues l'objet d'un débat très serré et parfois passionné. La FAO reconnaît que le génie génétique offre des possibilités d'accroître la production et la productivité de l'agriculture, de la foresterie et des pêches, Toutefois, elle est bien consciente des préoccupations suscitées par les risques liés à certains aspects des biotechnologies modernes. Ces risques se répartissent en deux catégories fondamentales: les effets sur la santé humaine et animale et les conséquences écologiques. La plus grande précaution est de rigueur pour limiter les risques de transfert de toxines d'une forme de vie à une autre, de création de nouvelles toxines et de transfert de composés allergènes d'une espèce à une autre, phénomènes qui pourraient donner lieu à des réactions allergiques non prévues. Les risques pour l'environnement incluent l'éventualité d'une allofécondation qui pourrait conduire, par exemple, à l'apparition de plantes adventices plus agressives ou d'espèces apparentées plus résistantes aux maladies ou au stress écologique, bouleversant l'équilibre de

l'écosystème. L'utilisation de cultivars modifiés contenant des traits améliorés comporte aussi un risque de perte de biodiversité du fait, par exemple, de l'éviction de cultivars traditionnels par un petit nombre de cultivars génétiquement modifiés.

La FAO est favorable à un système d'évaluation sur des bases scientifiques qui déterminerait de manière objective les avantages et les risques liés à chaque OGM. Cela suppose l'adoption d'une approche de précaution étudiant, cas par cas, les préoccupations légitimes suscitées par chaque produit ou procédé avant sa dissémination. Il convient d'évaluer les effets possibles de chaque produit ou procédé sur la biodiversité, l'environnement et l'innocuité des denrées alimentaires et la mesure dans laquelle les avantages contrebalancent, dans chaque cas, les risques. Le processus d'évaluation doit aussi tirer parti de l'expérience acquise par les autorités nationales chargées de la réglementation en matière d'autorisation de ces produits. Un suivi vigilant des effets postérieurs à la dissémination de ces produits et procédés s'impose également pour s'assurer de leur innocuité à plus long terme pour les êtres humains, les animaux et l'environnement.

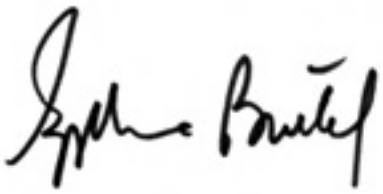
Actuellement, l'investissement dans la recherche biotechnologique a tendance à être concentré sur le secteur privé et orienté vers l'agriculture des pays à revenu élevé, où il existe un pouvoir d'achat pour ces nouveaux produits. Compte tenu de la contribution potentielle des biotechnologies à l'accroissement des approvisionnements alimentaires et à l'élimination de l'insécurité alimentaire et de la vulnérabilité, la FAO estime qu'il faudrait veiller à ce que les pays en développement, en général, et les agriculteurs pauvres en ressources, en particulier, bénéficient davantage de la recherche biotechnologique, tout en continuant à avoir accès à diverses sources de matériel génétique. La FAO propose à cet effet le renforcement des financements publics et du dialogue entre les secteurs public et privé.

La FAO continue à aider ses États Membres, et plus particulièrement les pays en développement, à recueillir les bénéfices liés à l'application des biotechnologies à l'agriculture, à la foresterie et aux pêches. Elle aide également les pays en développement à participer de manière plus efficace et équitable au commerce international des biens et denrées alimentaires. La FAO fournit des informations et une assistance technique, ainsi que des analyses socioéconomiques et écologiques, sur les principales questions d'importance mondiale liées aux progrès technologiques. Ainsi, avec l'Organisation mondiale de la santé (OMS), la FAO assure le secrétariat de la Commission du Codex Alimentarius qui vient de créer un Groupe de travail intergouvernemental spécial sur les aliments dérivés des biotechnologies (GTIAB), au sein duquel des experts désignés par les gouvernements mettront au point des normes, directives ou recommandations, selon le cas, concernant des aliments dérivés des biotechnologies ou des caractéristiques introduites dans les aliments par des méthodes biotechnologiques. La Commission du Codex Alimentarius étudie également des approches qui permettront au consommateur de choisir en connaissance de cause.

La FAO s'efforce en permanence de déterminer les avantages potentiels et les risques associés à l'utilisation des technologies modernes pour accroître la productivité et la production végétales et animales. Toutefois, c'est aux gouvernements membres qu'il incombe de formuler

des politiques en la matière. Pour pouvoir tirer pleinement parti des technologies, les pays doivent disposer des infrastructures, de l'appui financier et de l'expertise nécessaires. En ce qui concerne les OGM, il leur faudra aussi mettre en place le cadre de règlementation requis pour minimiser les risques potentiels. À cette fin, la FAO donne des conseils techniques pour la mise en place de cadres de réglementation appropriés dans les domaines de la sécurité biologique, de la sécurité sanitaire des aliments et des droits de propriété intellectuelle.

Nous invitons les lecteurs à nous faire part de leurs remarques et réactions sur cet outil de formation, pour nous aider à mieux remplir notre engagement permanent d'aider les pays membres à renforcer leurs capacités pour évaluer la sécurité sanitaire des aliments dérivés des biotechnologies modernes et mieux gérer tous les aspects en rapport avec la protection de la santé publique, de la production agricole et de l'environnement, conformément au concept de la «Prévention des risques biotechnologiques[1] dans le cadre de la biosécurité[2]» ●



Ezzeddine Boutrif
Directeur
Division de la nutrition et
de la protection des consommateurs

1 Prévention des risques biotechnologiques: "moyens de maîtriser, gérer ou contrôler les risques liés à l'utilisation ou à la libération d'organismes vivants modifiés issus de la biotechnologie susceptibles d'avoir sur l'environnement des effets pouvant nuire à la conservation et à l'utilisation durable de la diversité biologique, en tenant compte également des risques pour la santé humaine." PNUE/CDB. 1992. Convention sur la diversité biologique: Article 8(g).

2 Biosécurité: "approche stratégique intégrée pour analyser et gérer les risques pesant sur la vie et la santé des personnes, des animaux et des plantes et les risques associés pour l'environnement." FAO. 2007. Dossier FAO sur le biosécurité. ISBN 978-92-5-105729-2.

Sigles

AGN	Division de la nutrition et de la protection des consommateurs de la FAO
AGNS	Service de la qualité des aliments et des normes alimentaires de la FAO
AESA	Autorité européenne de sécurité des aliments
AII	Allergy and Immunology Institute of the ILSI
APUA	Alliance for the Prudent Use of Antibiotics
BCIL	Biotechnology Consortium of India Limited
CAC	Commission du Codex alimentarius
CCCB	Comité consultatif canadien de la biotechnologie
CDB	Convention sur la diversité biologique
ADN	Acide désoxyribonucléique
CE	Commission européenne
ELISA	Dosage immuno-enzymatique
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FSANZ	Normes alimentaires Australie Nouvelle-Zélande
CPG-SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse
BPL	Bonnes pratiques de laboratoire
AGM	Aliment génétiquement modifié
OGM	Organisme génétiquement modifié
CPL-HP	Chromatographie liquide à haute performance
CPL-RMN	Chromatographie en phase liquide couplée à la resonance magnétique nucléaire
CIGGB	Centre international pour le génie génétique et la biotechnologie
IFBC	International Food Biotechnology Council
IFBiC	ILSI International Food Biotechnology Committee
IFIC	International Food Information Council
IHCP	Institut pour la santé et la protection des consommateurs de la Direction générale du JRC
ILSI	International Life Sciences Institute
INFOODS	Réseau international du système de données sur l'alimentation
ISP	Independent Science Panel
JRC	Centre commun de recherche
OVM	Organisme vivant modifié
NDL	Nutrient Data Laboratory of the USDA
CSENO	Concentration sans effet nocif observé
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
ORF	Cadre ouvert de lecture

PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
ARN	Acide ribonucléique
SDS-PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate sodique
ADN-T	ADN de transfert
ONUDI	Organisation des Nations Unies pour le développement industriel
US FDA	United States Food and Drug Administration
US NAS	United States National Academy of Sciences
OMS	Organisation mondiale de la santé

Partie 1

Principes de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné

3 1. Introduction
3 Portée de l'outil de formation
3 Objectifs
3 Public cible et qualifications des formateurs
4 Contenu du programme de formation
4 Résultats escomptés

5 2. Concepts et principes de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné (dans les cadres de règlementation internationaux)
5 Introduction
5 Rôle de la Commission du Codex Alimentarius (CAC) dans la définition des normes de sécurité sanitaire des aliments
6 Liste des consultations internationales sur la sécurité sanitaire des aliments

8 3. L'approche comparative de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné
8 Introduction
8 Principes de l'approche comparative
9 Identification des effets non intentionnels
10 Quelques exemples de tests d'équivalence substantielle
11 Équivalence Substantielle – problèmes d'application
12 Remarques pour conclure
12 Références

14 4. Cadre de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné
14 Introduction
14 Le cadre du Codex pour l'évaluation de la sécurité sanitaire
15 Description de la plante à ADN recombiné
16 Description de la plante hôte et de son utilisation comme aliment
17 Description de l'organisme(s) donneur(s)
18 Description de la ou des modification(s) génétique(s)
20 Références

22 5. Caractérisation de la ou des modification(s) génétique(s)
22 Analyse moléculaire de l'insert d'ADN recombiné
24 Evénements de transformation des plantes générés de manière aléatoire
25 Détection de transgènes à l'aide d'amorces spécifiques à un événement
25 Degré de finesse des technologies actuelles

27 6. Évaluation de la toxicité éventuelle des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné
27 Introduction
27 Approche conceptuelle des études de toxicité
28 Méthodes utilisées pour déterminer l'absence de toxicité
33 Études de toxicité cronique
33 Assurance de qualité
33 Références

35 7. Évaluation de l'allergénicité potentielle (protéines) dans les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné
35 Allergies alimentaires
37 Allergénicité potentielle des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné
37 Stratégie d'évaluation de l'allergénicité
39 Références

41 8. Analyses de composition en constituants essentiels, évaluation des métabolites, procédés de transformation des aliments et modifications nutritionnelles
41 Analyse de composition
43 Procédés de transformation des aliments
44 Modification nutritionnelle
45 Nouvelles méthodes analytiques
46 Références

47 9. Perspectives pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de la prochaine génération de plantes à ADN recombiné
47 Introduction
48 Principes généraux régissant l'adjonction d'éléments nutritifs essentiels aux aliments
48 Biofortification
49 Références

51 10. Communication sur les risques entre les parties prenantes
51 Introduction
51 Caractéristiques essentielles de la communication sur les risques
52 Communication règlementaire sur les risques
54 La communication sur les risques: un processus de dialogue
56 La communication des risques dans l'évaluation de la sécurité sanitaire
57 Références

59 11. Glossaire des termes, des liens et des ressources
59 Glossaire
63 Liens et ressources

65 Annexes. Documents pertinents du Codex
66 Annexe 1. Principes pour l'analyse des risques liés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes CAC/GL 44-2003
69 Annexe 2. Directive régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné CAC/GL 45-2003

1. Introduction

Portée de l'outil de formation

Dans ce contexte, le présent outil a pour objet de présenter un cadre, fondé sur des principes et des directives internationalement reconnus, pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné. De plus, il introduit d'autres questions connexes, fournit des liens vers des ressources utiles et contient des informations pratiques sur l'organisation et la tenue d'un atelier de formation.

Plusieurs documents internationaux portant sur l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments génétiquement modifiés (AGM) autres que ceux dérivés de plantes à ADN recombiné sont en préparation et la FAO va aussi élaborer des matériels de formation complémentaires. Cet outil de formation spécifique ne traite pas la sécurité sanitaire des aliments dérivés d'autres organismes à ADN recombinés (tels que les micro-organismes et les animaux) ou des aliments pour animaux dérivés de plantes à ADN recombiné, et il ne prend pas non plus en considération les questions d'éthique, les aspects socio-économiques ou les risques environnementaux qui pourraient être associés à la mise en circulation de plantes à ADN recombiné.

Objectifs

Afin de promouvoir le renforcement des capacités d'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments, la FAO a appuyé, en collaboration avec de nombreux organismes internationaux, intergouvernementaux et gouvernementaux, l'élaboration d'un programme de formation normalisé pour aider les pays à appliquer des textes internationaux concernant l'analyse des risques associés aux produits qui contiennent des organismes génétiquement modifiés ou en sont dérivés. Plus spécifiquement, cet outil de formation devrait être utilisé pour mettre en pratique des programmes propres à:

- promouvoir une approche de réglementation internationale harmonisée, à la demande des pays, afin de garantir l'application cohérente et uniforme des normes internationales;
- fournir aux organismes de règlementation des pays bénéficiaires des informations sur les approches d'évaluation des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné, reconnues au niveau international;
- promouvoir une approche transparente, fondée sur des éléments scientifiques, pour l'introduction et l'utilisation sans danger des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné.

Public cible et qualifications des formateurs

La formation s'adresse aux autorités et aux responsables nationaux de la sécurité sanitaire des aliments et /ou aux scientifiques chargés de former d'autres personnes à l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné. Quoique conçu principalement à l'intention d'institutions gouvernementales des pays en développement, cet outil pourrait aussi être utile aux institutions des pays développés, ainsi qu'aux organisations

donatrices et aux institutions qui soutiennent des activités de renforcement des capacités dans le domaine de la sécurité sanitaire des aliments.

Un formateur qualifié devrait avoir un doctorat en sciences naturelles ou une combinaison équivalente d'études et d'expérience, ainsi qu'une vaste expérience en tant que responsable de la règlementation ou chercheur principal spécialisé dans une discipline scientifique en rapport avec l'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM (biologie moléculaire, sélection végétale, biochimie, immunologie, toxicologie, santé et nutrition humaines ou animales, etc.). Une expérience de travail dans un cadre multidisciplinaire avec des personnes de nationalité, d'ethnie et de culture différentes serait appréciée. Une bonne maîtrise de l'informatique, des techniques de communication en ligne et de recherche documentaire est souhaitable. Le formateur devrait aussi avoir une connaissance approfondie des activités de recherche-développement dans les secteurs public et privé, et avoir d'excellentes aptitudes d'expression verbale, de communication et de présentation, en particulier avec des publics différents. Une publication dans une revue scientifique ou dans l'évaluation d'un dossier est exigée. Les formateurs devraient être sélectionnés sur la base de leurs capacités personnelles dans le cadre d'un processus transparent. Pour les stages de formation internationaux, il convient de veiller à une représentation équilibrée des membres des deux sexes et des régions géographiques.

Contenu du programme de formation

Le programme est constitué de trois parties et accompagné d'un CD-ROM contenant les supports visuels et les autres matériels de référence pertinents. La première partie, *Principes de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné*, donne des orientations pour la mise en œvre d'un cadre efficace pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné. La deuxième partie, *Outils et techniques à l'intention des formateurs* est un guide pratique pour la préparation et la tenue d'un atelier sur le même thème. Elle contient plusieurs listes récapitulatives et fiches, un modèle d'ordre du jour et un modèle de fiche d'évaluation d'un atelier, et cinq modules de présentation utiles pour les formateurs. Toutes les fiches, présentations et copies des documents pertinents du Codex alimentarius sont incluses dans le CD-ROM d'accompagnement. La troisième partie consacrée aux *Études de cas* présente trois dossiers d'évaluation de la sécurité sanitaire qui ont été résumés pour les besoins de la formation[3]. Les trois dossiers ont été constitués sur la base des données et informations soumises pour les évaluations règlementaires de la sécurité sanitaire des aliments conduites par des institutions gouvernementales telles que Santé Canada, United States Food and Drug Administration (US FDA) et Normes alimentaires Australie Nouvelle-Zélande (FSANZ). Ces études représentent les contributions de Agbios, Inc., Ottawa, (Canada) et du Gouvernement canadien, représenté par Santé Canada[4].

Résultats escomptés

À l'achèvement de la formation dispensée à l'aide de ce guide, les participants seront capables de planifier et de dispenser une formation à l'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM que les autorités nationales compétentes, les responsables de la règlementation et/ou les scientifiques spécialisés dans ce domaine pourront intégrer dans leurs propres programmes de formation ●

[3] Pour renforcer l'utilité des études de cas en tant qu'outils de formation, certains éléments d'information ont été résumés et les données présentées dans les études de cas ne sont qu'un condensé de celles qui ont été effectivement déposées. Les études de cas ne constituent en aucune manière un dossier de demande complet, ni même une évaluation complète de la sécurité.

[4] Ces études de cas ont été incluses dans ce programme de formation telles quelles, sans aucune modification ni amélioration de la FAO. Les points de vue exprimés dans ces études ne reflètent pas nécessairement ceux de la FAO.

2. Concepts et principes de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné (dans les cadres de règlementation internationaux)

Introduction

Bien que la biotechnologie moderne élargisse le champ des modifications génétiques qui peuvent être introduites dans les organismes utilisés comme aliments, elle ne débouche pas automatiquement sur la production d'aliments moins sûrs que ceux obtenus à l'aide de techniques plus conventionnelles (OCDE, 1993; US NAS, 2004). Ce principe a des ramifications importantes pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM. Il implique qu'il n'est pas nécessaire de fixer des normes de sécurité sanitaire nouvelles ou différentes et que les principes déjà établis de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments continuent de s'appliquer. De plus, l'introduction de modifications génétiques spécifiques devrait permettre d'évaluer l'innocuité de manière plus directe et mieux ciblée.

Si les pays adoptent des approches différentes, ancrées ou non dans la loi, pour réglementer les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné, tous utilisent à peu près les mêmes critères pour évaluer la sécurité sanitaire de ces produits (Banque Mondiale, 2003), grâce aux efforts concertés qui ont été déployés au niveau international pour harmoniser l'évaluation des risques associés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes (Tableau 1). Cette collaboration a grandement facilité l'élaboration d'approches internationalement reconnues de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments issus de biotechnologies, décrites dans deux documents importants publiés en 2003 par la Commission du Codex Alimentarius (CAC)[5]: *Principes pour l'analyse des risques liés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes* (ci-après dénommés «Principes du Codex»; voir Annexe 1) et *Directive régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné CAC GL 45-2003* (ci-après dénommée «Directive du Codex»; voir Annexe 2).

Bien qu'ils reconnaissent que les principes d'évaluation des risques déjà établis soient difficilement applicables aux aliments, qui sont par nature des composés complexes et non de simples substances chimiques que l'on peut examiner individuellement, les auteurs de ces documents décrivent l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné comme un processus qui s'inscrit dans le cadre établi de l'évaluation des risques. L'évaluation de la sécurité sanitaire est en substance la première étape consistant à identifier tous les dangers qui peuvent être associés aux aliments, pour ensuite évaluer les risques pour la santé humaine.

Rôle de la Commission du Codex alimentarius dans la définition des normes de sécurité sanitaire des aliments

La Commission du Codex alimentarius a été créée en 1963 par la FAO et l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) afin d'élaborer des normes alimentaires, des lignes directrices et d'autres textes, tels que des Codes d'usages, dans le cadre du Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires. Les buts principaux de ce programme sont la protection de la santé des consommateurs, la promotion de pratiques loyales dans le commerce des aliments et la

[5] Parallèlement, la Commission du Codex Alimentarius a également publié un troisième document intitulé *Directive régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments produits à l'aide de microorganismes à ADN recombiné.*

Tableau 2.1. Principales consultations internationales sur l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné (1990-2006)

Année	*Organisation*	*Titre et lien (si disponible)*
1990	FAO/OMS	Consultation mixte FAO/OMS sur les stratégies visant à évaluer la sécurité sanitaire des aliments produits au moyen des biotechnologies. Genève, Suisse, 5–10 nov. 1990. (http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/1990/fr/index.html)
1990	IFBC	Biotechnologies and food: assuring the safety of foods produced by genetic modification. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 12: S1–S196.
1993	OMS	Health aspects of marker genes in genetically modified plants. Report of a WHO Workshop. Copenhague, Danemark, 21–24 sept. 1993.
1994	OMS	Application of the principles of substantial equivalence to the safety evaluation of foods or food components from plants derived by modern biotechnology. Rapport d'un atelier de l'OMS, Copenhague, Danemark, 31 oct.–4 nov. 1994.
1996	FAO/OMS	Biotechnology and food safety. Report of a Joint FAO/OMS Consultation, Rome, Italie, 30 Sept.–4 Oct. 1996. FAO Food and Nutrition Paper No. 61.
1996	ILSI	ILSI Allergy and Immunology Institute (AII) guidance for assessing the allergenic potential of foods derived from biotechnology.
1997	OCDE	Évaluation de l'innocuité des nouveaux aliments: Résultats d'une enquête de l'OCDE sur les banques de sérum destinée à l'expérimentation du pouvoir allergisant et sur l'utilisation des banques de données. (http://www.olis.OCDE.org/olis/1997doc.nsf/LinkTo/sg-icgb(97)1-final)
1998	OCDE	Report of the OCDE workshop on the toxicological and nutritional testing of novel foods. (http://www.olis.OCDE.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/sg-icgb(98)1-final)
2000	FAO/OMS	Rapport d'une consultation conjointe d'experts FAO/OMS sur les aliments produits par biotechnologie – Aspects de la salubrité des aliments génétiquement modifiés d'origine végétale. Siège de l'OMS, Genève, Suisse, 29 mai–2 juin 2000. (http://www.fao.org/wairdocs/ae584f/ae584f09.htm)
2000	CA	Première session du Groupe spécial intergouvernemental du Codex sur les aliments dérivés des biotechnologies. Chiba, Japon, Mars 2000. (http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/ctf_march2000/en/index.html)
2001	FAO/OMS	Évaluation de l'allergénicité des aliments génétiquement modifiés, Consultation mixte FAO/OMS d'experts sur les aliments dérivés des biotechnologies. Rome, Italie, 22–25 janvier 2001.
2001	CAC	Seconde session du Groupe spécial intergouvernemental du Codex sur les aliments dérivés des biotechnologies. Chiba, Japon, Mars. 2001. (ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/005/Y0412F/Y0412f.pdf)
2002	OCDE	Report of the OCDE Workshop on the nutritional assessment of novel foods and feeds. (http://www.olis.OCDE.org/olis/2002doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2002)6)
2002	CAC	Troisième Session du groupe spécial intergouvernemental du Codex sur les aliments dérivés des biotechnologies. Yokohama, Japon, Mars 2002. (ftp://ftp.fao.org/codex/Alinorm03/al03_34f.pdf)
2002	WHO	Réunion de parties prenantes sur le projet de document de l'OMS "Biotechnologie alimentaire moderne, santé et développement: étude à partir d'exemples concrets". OMS, Genève.
2003	CAC	Quatrième Session du groupe spécial intergouvernemental du Codex sur les aliments dérivés des biotechnologies. Yokohama, Japon, Mars 2003. (http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/july2003/en/index.html)
2003	OCDE	Report on the questionnaire on biomarkers, research on the safety of novel foods and feasibility of post-market monitoring. (http://www.olis.OCDE.org/olis/2003doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2003)9)
2006	FAO	Consultation d'experts FAO sur la prévention des risques biotechnologiques dans le cadre de la biosécurité: Contribuer à une agriculture et à une production alimentaire durables. 28 février – 3 mars 2006, Rome, Italie. (http://www.fao.org/ag/agn/agns/meetings_consultations_2006_fr.asp)

coordination de tous les travaux de normalisation ayant trait aux aliments entrepris par des organisations aussi bien gouvernementales que non gouvernementales[6]. À sa 23e session, la CAC est convenue d'établir le Groupe spécial intergouvernemental du Codex sur les aliments dérivés des biotechnologies dont les fonctions seraient les suivantes:

- élaborer des normes, des directives ou autres principes, selon qu'il convient, pour les aliments dérivés des biotechnologies modernes;
- coordonner et collaborer étroitement, autant que de besoin, avec les Comités compétents du Codex dans le cadre de leur mandat pour ce qui touche aux aliments dérivés des biotechnologies modernes;
- tenir pleinement compte des travaux réalisés par les autorités nationales, la FAO, l'OMS, les autres organisations internationales et les autres instances internationales concernées.

Dans le délai de quatre ans qui lui avait été imparti, le Groupe spécial a accompli sa mission qui a débouché sur la publication des Principes et de la Directive du Codex cités plus haut.

Liste des consultations internationales sur la sécurité sanitaire des aliments

Plusieurs organisations internationales ont souligné la nécessité de convoquer des experts pour examiner les questions, scientifiques ou non, qui se posent en matière de sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné ou analyser les conséquences de leur présence dans l'environnement, et de réduire le nombre de débats qui se tiennent sur ce thème dans les différents pays auxquels ces produits sont destinés. Des organisations comme la FAO, l'OMS, l'OCDE, l'ILSI et l'IFBC ont joué un rôle important dans les années 1990 en facilitant et soutenant plusieurs consultations d'experts sur le sujet, qui ont débouché sur l'établissement de la Commission du Codex Alimentarius en 2000. On trouvera ci-dessous une liste des principales références de ces consultations ●

6 http://www.codexalimentarius.net/web/index_fr.jsp

3. L'approche comparative de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné

Introduction

Jusqu'ici, l'évaluation de la sécurité des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné a reposé sur le principe selon lequel ces produits peuvent être comparés aux aliments traditionnels dont l'utilisation sans risque est prouvée. L'objectif est de déterminer si l'aliment génétiquement modifié présente des dangers nouveaux ou modifiés par rapport à l'aliment traditionnel de référence. Il ne s'agit pas d'établir un niveau de sécurité absolu, mais de déterminer si le nouveau produit est aussi sûr que son équivalent traditionnel, et offre une certitude raisonnable qu'aucun dommage ne résultera des utilisations envisagées dans les conditions de transformation et de consommation prévues.

Principes de l'approche comparative

Les modes de transformation et de consommation ont leur importance, même pour les aliments traditionnels. Un certain nombre de plantes consommées par les humains sont très toxiques à l'état brut, mais acceptées comme aliment parce que les méthodes de transformation modifient ou éliminent leur toxicité. Par exemple, la racine de manioc est relativement toxique, mais une transformation appropriée en fait un aliment nutritif et largement consommé. Il en va de même pour les fèves de soja et les fèves de Lima, qui contiennent des facteurs antinutritionnels (ex: inhibiteur de trypsine de soja et lectines). La pomme de terre et la tomate peuvent contenir des glyco-alcaloïdes, respectivement solanine et alpha tomatine, à des concentrations toxiques. La présence d'une substance toxique dans une variété de plante n'exclut donc pas nécessairement son utilisation comme aliment. Lorsque l'on étudie la sécurité sanitaire d'un aliment dérivé de plantes à ADN recombiné, il est par conséquent important d'examiner toute la gamme de substances toxiques, d'éléments nutritifs indispensables ou d'autres facteurs pertinents qu'il peut contenir, ainsi que le procédé de transformation, son utilisation et les niveaux d'exposition prévus. Le choix des composés à analyser est fonction de l'expérience acquise avec les plantes cultivées traditionnelles et le Groupe d'étude de l'OCDE sur la sécurité des nouveaux aliments destinés à la consommation humaine et animale a préparé un certain nombre de documents de consensus internationalement reconnus qui donnent des orientations sur les composés spécifiques qu'il convient d'analyser.

L'approche comparative a été intégrée dans le concept d'équivalence substantielle (ou équivalence en substance) élaboré avant que les AGM n'arrivent sur le marché. Le concept a été décrit pour la première fois dans une publication de l'OCDE en 1993. Ce document est le fruit des travaux de 60 experts de 19 pays membres de l'OCDE, qui ont étudié pendant plus de deux ans la manière d'évaluer la sécurité sanitaire des aliments issus des biotechnologies modernes. Le concept d'équivalence en substance a par la suite été approuvé par une consultation mixte d'experts FAO/OMS en 1996. Cette dernière a reconnu que, bien que la détermination de l'équivalence en substance ne constitue pas en soi une évaluation de la sécurité sanitaire, elle est utile pour structurer l'analyse de la sécurité sanitaire des caractéristiques et de la composition

des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné. Etablir l'équivalence par rapport à un aliment traditionnel de référence ayant un historique d'utilisation sans risque signifie que le nouveau produit sera aussi sûr dans des conditions de consommation et de transformation similaires.

Le concept d'équivalence en substance présente un avantage important, qui est d'offrir une certaine souplesse qui peut être utile dans l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés des biotechnologies modernes. Il aide à identifier d'éventuelles différences, recherchées ou involontaires, sur lesquelles pourrait ensuite se focaliser l'analyse de l'innocuité. Étant donné qu'il repose sur un processus comparatif, le concept de l'équivalence en substance peut être appliqué en plusieurs points de la chaîne alimentaire (par exemple au niveau du produit alimentaire récolté ou non transformé, des différentes fractions transformées ou du produit ou ingrédient alimentaire final). L'évaluation de la sécurité sanitaire peut ainsi être ciblée sur le niveau le plus approprié selon le type de produit considéré.

La Consultation mixte FAO/OMS d'experts sur les aliments dérivés des biotechnologies – Aspects de la sécurité sanitaire des aliments génétiquement modifiés d'origine végétale (FAO/OMS, 2000) a réexaminé le concept d'équivalence substantielle et conclu que l'évaluation de la sécurité sanitaire nécessitait une approche au cas par cas, progressive et intégrée, qui peut être facilitée par une série structurée de questions. Les experts ont réaffirmé que le concept d'équivalence substantielle, centré sur la détermination des similitudes et des différences entre les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné et leurs équivalents traditionnels, facilitait l'identification d'éventuels problèmes de salubrité ou de nutrition et que cette approche comparative était la stratégie la plus appropriée à ce jour pour évaluer la sécurité sanitaire et la qualité nutritionnelle des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné. Les experts ont en outre précisé que la détermination de l'équivalence substantielle n'était pas l'aboutissement d'une évaluation de la sécurité sanitaire puisqu'elle ne caractérisait pas le danger et servait plutôt à structurer l'évaluation de la sécurité sanitaire d'un aliment dérivé d'une plante à ADN recombiné par rapport à son équivalent traditionnel de référence. Les participants étaient satisfaits de l'approche employée pour évaluer la salubrité des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné dont l'usage commercial a été approuvé et ils ont conclu que l'application du concept d'équivalence substantielle contribuait à créer un cadre solide pour l'évaluation de la salubrité. De fait, ils étaient d'avis qu'à l'heure actuelle, il n'existe pas de stratégie capable de fournir une meilleure garantie de salubrité (FAO/OMS 2000).

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 13. Le concept d'équivalence substantielle est une étape clé dans le processus d'évaluation de la sécurité sanitaire. Ce n'est pas en soi une évaluation de sécurité sanitaire, mais plutôt le point de départ utilisé pour structurer l'évaluation de la sécurité sanitaire d'un nouvel aliment par rapport au produit traditionnel de référence[7]. Ce concept est utilisé pour identifier les similarités et les différences entre le nouvel aliment et son produit traditionnel de référence. Il aide à l'identification de problèmes éventuels de sécurité ou de nutrition et est considéré comme la stratégie la plus appropriée à ce jour pour évaluer la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné. Effectuée de cette façon, l'évaluation des risques ne peut garantir la sécurité absolue du nouveau produit. Elle vise plutôt à évaluer la sécurité associée à tout écart observé afin de pouvoir comparer la sécurité offerte par le nouveau produit à celle du produit traditionnel de référence.

La Directive du Codex contient la référence suivante à l'équivalence substantielle (paragraphe 13). Tous les passages de la Directive du Codex auquel se réfère le document figurent en encadré, avec l'indication des paragraphes correspondants (Annexe 2).

7 Concept d'*équivalence substantielle* décrit dans le rapport de la Consultation mixteFAO/OMS d'experts (2000) (Document WHO/SDE/PHE/FOS/00.6, OMS, Genève, 2000).

Identification des effets non intentionnels

L'applicabilité du concept d'équivalence substantielle dans l'évaluation de la sécurité sanitaire des plantes à ADN recombiné a été contestée (Millstone *et al.*, 1999). Toutefois, son utilité est bien établie, et plusieurs consultations d'experts (FAO/OMS, 1996, 2000) ont estimé que les évaluations fondées sur ce concept étaient à l'heure actuelle l'approche la plus pratique pour se prononcer sur la salubrité des aliments issus des biotechnologies modernes. L'équivalence peut être déterminée relativement facilement quand le nouveau produit génique est ciblé et peut être utilisé directement sans entraîner d'autres modifications des voies métaboliques existantes de la

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 14. Lors de la réalisation de l'objectif consistant à conférer un caractère spécifique (effet souhaité) à une plante par l'insertion des séquences d'ADN définies, des caractères additionnels peuvent, dans certains cas, être acquis ou des caractères existants peuvent être perdus ou modifiés (effets involontaires). L'apparition éventuelle d'effets involontaires n'est pas limitée à l'usage des techniques de manipulation in vitro des acides nucléiques. C'est un phénomène inhérent et général qui peut aussi se produire au cours des sélections classiques. Les effets involontaires peuvent être nocifs, bénéfiques ou neutres en ce qui concerne la santé de la plante ou la sécurité sanitaire des aliments dérivés de celle-ci. Des effets involontaires se produisant dans les plantes à ADN recombiné pourraient aussi être dus à l'insertion de séquences d'ADN et/ou à des sélections classiques ultérieures des plantes à ADN recombiné. L'évaluation de la sécurité doit inclure des données et des informations pour réduire la possibilité qu'un aliment dérivé d'une plante à ADN recombiné ait un effet néfaste, involontaire sur la santé humaine.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 15. Des effets involontaires peuvent résulter de l'insertion aléatoire de séquences d'ADN dans le génome de la plante, cette insertion pouvant interrompre ou réprimer des gènes existants et activer des gènes silencieux, ou induire des modifications d'expression des gènes existants. Des effets involontaires peuvent également résulter de la formation de nouveaux ou modifiés profils de métabolites. Par exemple, de hauts niveaux d'expression d'enzymes peuvent induire des effets biochimiques secondaires ou des changements dans la régulation des voies métaboliques et/ou de niveaux modifiés de métabolites.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 16. Les effets involontaires dus à la modification génétique peuvent être subdivisés en deux groupes: ceux qui sont « prévisibles » et ceux qui sont « imprévus ». Beaucoup d'effets involontaires sont, dans la plupart des cas, prévisibles sur la base des connaissances que l'on a du gène introduit et de ses implications métaboliques ou du site d'insertion. Du fait de l'accroissement des informations sur le génome végétal et de l'accroissement de la spécificité en termes de matériel génétique introduit par les techniques de recombinaison d'ADN comparativement aux méthodes classiques de sélection végétale, il pourra être plus facile de prédire les effets involontaires d'une modification particulière. Des techniques de biologie et de biochimie moléculaires peuvent aussi être utilisées pour analyser les changements éventuels au niveau de la transcription des gènes et de la traduction des messagers, qui pourraient conduire à des effets involontaires.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 17. L'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de végétaux à ADN recombiné fait appel à des méthodes précises pour identifier et détecter de tels effets involontaires et des procédures pour évaluer leur explication biologique et leur impact éventuel sur la sécurité sanitaire des aliments. Diverses données et informations sont nécessaires pour évaluer des effets involontaires puisqu'un simple test n'est pas suffisant pour détecter tous les effets involontaires possibles ou identifier, avec certitude, ceux qui sont pertinents en matière d'impact sur la santé humaine. Ces données et informations, prises dans leur globalité, fournissent une garantie que l'aliment présente une faible probabilité d'avoir des effets néfastes sur la santé humaine. L'évaluation des effets involontaires prend en compte les caractéristiques agronomiques/phénotypiques de la plante qui sont communément observées par les sélectionneurs lors de la sélection de nouvelles variétés à commercialiser. Ces observations des sélectionneurs fournissent un premier crible des plantes qui révèlent des caractères indésirables. Les nouvelles variétés qui passent cette sélection sont soumises à une évaluation de la sécurité sanitaire comme décrit aux sections 4 et 5.

plante. Cependant, les modifications des plantes à ADN recombiné et des aliments qui en sont issus peuvent ne pas être reflétées dans les composés connus sélectionnés au préalable pour déterminer l'équivalence, en raison d'effets non intentionnels dus à l'insertion du nouveau gène. En pareils cas, des approches de profilage non ciblées sont essentielles pour détecter d'éventuels effets non recherchés imprévisibles. Les stratégies génomiques qui utilisent des outils bioinformatiques peuvent être efficaces pour analyser les changements non intentionnels survenant au niveau de la transcription de l'ARN, des acides aminés, des protéines ou du métabolisme (Stiekema et Nap, 2004). Les paragraphes 14 à 17 de la Directive du Codex traitent spécifiquement des effets involontaires.

Quelques exemples de tests d'équivalence substantielle

Comme le démontrent les exemples suivants, notre capacité à évaluer des conséquences involontaires est mise au défi par de nouveaux produits dont les profils nutritionnels ont été

modifiés intentionnellement. Le premier exemple est celui du riz génétiquement modifié à faible teneur en glutéline, créé par une technique antisens, en vue de la production commerciale de saké. La diminution du taux de glutéline s'est accompagnée d'une augmentation non intentionnelle du taux de prolamines. La modification des prolamines n'avait pas été détectée par les analyses nutritionnelles standards telles que le profil des protéines totales ou celui des acides aminés; elle ne l'a été que par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate sodique (SDS-PAGE). La modification du taux de prolamines n'a pas affecté l'utilisation industrielle, mais affecterait peut-être la qualité nutritionnelle et le potentiel allergisant si le riz était utilisé comme aliment. Un autre exemple est celui du "riz doré", produit du génie génétique destiné à produire un niveau élevé de bêta-carotène, précurseur de la vitamine A. De façon inattendue, on a constaté que cette modification s'était accompagnée d'une accumulation des xanthophylles. Ce changement n'avait pas été mis en évidence par les analyses nutritionnelles standards, mais il a été détecté à la suite d'analyses des caroténoïdes par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Comme le montrent ces deux exemples, le fait de cibler un seul nutriment d'une voie métabolique complexe peut conduire à des altérations involontaires des niveaux d'autres constituants, et des méthodologies d'analyses spécialisées peuvent être nécessaires pour évaluer les altérations du profil global des nutriments.

En cas d'introduction d'une modification nutritionnelle significative dans un aliment, il peut être nécessaire d'organiser une surveillance après sa mise sur le marché, principalement pour déterminer si les schémas d'apport alimentaire ont changé.

Équivalence Substantielle – problèmes d'application

Le concept d'équivalence substantielle est utilisé pour structurer l'évaluation de la sécurité sanitaire et identifier les similitudes et les différences entre un nouvel aliment et son produit traditionnel de référence. Il est admis que l'équivalence substantielle n'est pas en soi une évaluation de la sécurité sanitaire, ni un aboutissement, mais qu'elle représente plutôt un point de départ pour l'évaluation de la sécurité sanitaire (FAO/OMS, 2000). Lorsque l'on adopte l'approche fondée sur le concept d'équivalence substantielle, les points suivants doivent être pris en considération.

Premièrement, le concept ne peut être utilisé que s'il existe un référentiel approprié et si des données sont disponibles ou peuvent être générées concernant cet élément. Le choix du référentiel est donc d'une importance cruciale pour l'application efficace du concept. Cet élément de référence doit avoir des antécédents d'utilisation sûre bien documentés. Si des effets néfastes ont été associés à ce type d'aliment particulier, les composants spécifiques qui sont considérés comme étant à l'origine de ces effets doivent être décrits et bien caractérisés pour permettre une comparaison efficace. Il peut être difficile d'établir une « ligne de base » pour des analyses comparatives si la plante à ADN recombiné est créée pour être cultivée dans des conditions de stress qui ne permettent pas la croissance du produit traditionnel de référence.

Deuxièmement, il convient d'identifier au cas par cas les paramètres pertinents et spécifiques de la plante qui doivent être comparés pour établir une équivalence substantielle, car il est possible que des changements involontaires de la composition soient négligés dans l'approche comparative.

Troisièmement, en raison de la variabilité naturelle de la plupart des paramètres mesurés dans les systèmes biologiques, il peut être difficile d'interpréter la signification des changements observés. Une approche comparative repose donc sur une compréhension exacte des variations de la ligne de base des paramètres à comparer. Le choix du référentiel aura une incidence sur l'amplitude des variations des données de la ligne de base et il doit être attentivement évalué par rapport à l'hypothèse de risque qui sous-tend la sélection des paramètres.

Remarques pour conclure

L'évaluation de la sécurité sanitaire d'un aliment entier nécessite une approche différente de celle qui a été utilisée pour évaluer l'innocuité de substances chimiques individuelles comme les additifs alimentaires et les pesticides. Contrairement aux substances chimiques individuelles, les aliments entiers sont constitués de divers composés qui contribuent à leur valeur nutritionnelle. Des aliments produits à partir de nombreuses plantes cultivées peuvent aussi contenir des produits toxiques naturels, des facteurs antinutritionnels et d'autres substances qui sont importants pour la plante mais qui, s'ils atteignent une concentration suffisante dans l'aliment, peuvent être nuisibles pour l'homme. La Directive du Codex sur les plantes à ADN recombiné recommande d'utiliser une approche comparative pour déterminer si un aliment dérivé d'une plante à ADN recombiné est aussi sûr qu'un aliment de référence approprié. Cette approche se fonde sur l'hypothèse que les plantes cultivées obtenues par des méthodes traditionnelles ont désormais acquis un historique d'utilisation sans risque pour les consommateurs, les animaux et l'environnement. A l'aide de techniques traditionnelles, les obtenteurs ont sélectionné des variétés de plantes cultivées qui contiennent individuellement des milliers de substances et qui sont considérées globalement comme sans risques pour la consommation humaine.

Références

FAO/OMS. 1996. Biotechnology and food safety, FAO/WHO consultation 30 Sept–4 Oct 1996. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Genève. http://www.fao.org/ag/agn/food/pdf/biotechnology.pdf

FAO/OMS. 2000. Aspects de la salubrité des aliments génétiquement modifiés d'origine végétale, Consultation FAO/OMS 29 mai–2 juin 2000. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Geneva. http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/ec_june2000/en/index.html

Millstone, *et al.* 1999. Beyond substantial equivalence. *Nature*, 401: 525–526.

OCDE. 1993. Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology, concepts and principles. Organisation pour la coopération et le développement économiques (OCDE), Paris.

OCDE. 2000. Rapport du Groupe d'étude sur la sécurité des nouveaux aliments destinés à la consommation humaine et animale. C(2000)86/ADD1. Organisation pour la coopération et le développement économiques (OCDE), Paris.

Stiekerma W.J. & Nap P.J. 2004. Bioinformatics for biosafety: predicting the allergenicity in GM food. In P.J. Nap, A. Atanosov & W.J. Stiekema, eds. *Genomics for biosafety in plant biotechnology*, pp. 98–116. NATO Science Series, Series I – Life and behavioral sciences, Vol 359. Amsterdam, IOS Press.

United States National Academy of Sciences. 2004. Safety of genetically engineered foods: approaches toassessing unintended health effects. Washington, DC, The National Academies Press.

Banque mondiale. 2003. Biosafety regulation: a review of international approaches (Report No. 26028). The World Bank Agriculture and Rural Development Department, Washington, DC.

Autres ressources

ILSI. 2004. Nutritional and safety assessment of foods and feeds nutritionally improved through biotechnology. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 3: 38–104.

OCDE. 2000. Genetically modified foods: widening the debate on health and safety. (updated document of "Substantial equivalence and the safety assessment of GM foods) Organisation pour la coopération et le développement économiques, Paris. http://www.OCDE.org/dataOCDE/34/30/2097312.pdf

OMS. 1995. Application of the principles of substantial equivalence to safety evaluation of foods or food components from plants derived by modern biotechnology. Rapport d'un atelier de l'OMS. Organisation Mondiale de la Santé, Genève. OMS/FNU/FOS/95.1.

OMS. 2005. Biotechnologie alimentaire moderne, santé et développement: étude à partir d'exemples concrets. Organisation Mondiale de la Santé, Genève. http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/biotech_fr.pdf ●

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 règlementation 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

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.

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.

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") selectionnées 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 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.

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).

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 règlementaire 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 pathogénicitéou 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.

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).

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

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'obtenteur l'utilisation et la distribution commerciales de la plante à ADN recombiné, et d'autre part pour permettre aux pays 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'obtenteur 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'obtenteur 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 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.

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 évidence 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. Powlowski 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 (Arencibia *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) gènes(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 règlementaire.

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 (*Oriza 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 ●

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 règlementation 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]

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.

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

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.

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.

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 déceler 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 modifiée[11] 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 règlementation 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 sources[12].

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 FlavrSavr™, 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 recueillies 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.

Evénements 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 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 rejetées[13]. De même, lors de la mise au point de plantes à ADN recombiné, les lignées modifiées qui ne sont pas conformes pas 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-intentionnels[14].

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).

6. Évaluation de la toxicité éventuelle des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné

Introduction

L'évaluation des risques prend aussi en considération l'estimation et l'évaluation du niveau et de la fréquence de l'ingestion d'aliments issus de plantes à ADN recombiné, qui sont fonction de la fréquence et du degré d'exposition de la population aux nouvelles substances exprimées, comme les protéines, les métabolites ou les composés endogènes, dont les concentrations dans l'aliment ont été modifiées à la suite de l'insertion du nouveau gène (et/ou d'autres effets non intentionnels résultant d'une modification génétique).

On peut avoir recours à des essais toxicologiques classiques inspirés des tests initialement mis au point pour des substances chimiques (telles que les additifs alimentaires, les pesticides et les contaminants alimentaires) pour évaluer la sécurité sanitaire des substances nouvellement exprimées. On peut déterminer la concentration sans effet nocif observé (CSENO) de la nouvelle substance, puis le coefficient de sécurité attaché au niveau d'exposition prévu dans la population générale. L'application de ce coefficient de sécurité permet de dériver la dose journalière acceptable ou tolérable. Ces analyses ne seront efficaces que si elles sont conçues selon l'identité et la fonction biologique des substances considérées.

Dans la pratique, les études toxicologiques classiques sur la salubrité des aliments entiers ne sont cependant pas très significatives car les aliments sont des mélanges complexes de composés caractérisés par une large variabilité en termes de composition et de valeur nutritionnelle. Il peut donc être extrêmement difficile de détecter les éventuels effets néfastes et de conclure à un lien entre ces effets et une caractéristique de l'aliment. Ces difficultés liées à l'application des approches toxicologiques classiques ont conduit à l'élaboration du concept d'équivalence substantielle. Cette approche reconnaît que le but de l'évaluation n'est pas d'instituer une salubrité absolue, mais de chercher à savoir si les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné sont aussi sûrs que leur équivalent traditionnel de référence.

Approche conceptuelle des études de toxicité

L'approche conceptuelle de l'évaluation de la toxicité potentielle des aliments suppose de procéder à la caractérisation biochimique du nouveau produit issu de l'élément d'ADN inséré, au moyen d'études de digestibilité *in vitro*, d'analyses visant à identifier les similitudes avec les séquences d'acides aminés de toxines connues et d'études de toxicité aiguë orale basées sur un modèle animal.

S'il ressort de ces études qu'un effet à plus long terme est probable, des tests supplémentaires de toxicité chronique et subchronique devront être effectués. Les études de digestibilité *in vitro* ont pour objectif de déterminer la résistance du nouveau produit à l'acide, en simulant les conditions des liquides gastriques et intestinaux. La séquence des six acides aminés de la partie N terminale est comparée à celle de toxines connues afin de déterminer les similitudes. Si la similitude est importante, il est possible que le nouveau produit du gène inséré soit une toxine. Le nouveau produit est alors soumis à des études de toxicité

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 34. Les techniques de manipulation *in vitro* des acides nucléiques permettent l'introduction d'ADN, qui peut résulter en la synthèse de nouvelles substances dans les plantes. Ces nouvelles substances peuvent être des composés classiques des plantes alimentaires, comme les protéines, les graisses, les hydrates de carbone, les vitamines, qui sont nouveaux dans le contexte de cette plante à ADN recombiné. Les nouvelles substances peuvent également comprendre de nouveaux métabolites résultant de l'activité des enzymes générées par l'expression de l'ADN introduit.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 35. L'évaluation de la sécurité sanitaire devrait tenir compte de la nature chimique et la fonction de la nouvelle substance exprimée et mesurer la concentration de la substance dans les parties comestibles de la plante à ADN recombiné, en incluant, le cas échéant, les valeurs moyennes et ses écart-types. L'exposition par le régime alimentaire actuel et les effets éventuels sur des groupes particuliers de la population devraient aussi être considérés.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 36. Les informations devraient être fournies pour s'assurer que les gènes d'organisme(s) donneur(s) codant pour des toxines connues ou des facteurs antinutritionnels présents dans le ou les organisme(s) donneur(s) ne sont pas transférés à des plantes à ADN recombiné qui n'expriment pas normalement ces toxines ou caractéristiques antinutritionnels. Cette garantie est particulièrement importante dans les cas où une plante à ADN recombiné est préparée différemment du végétal donneur, étant donné que les techniques de transformation alimentaire habituellement associées à l'organisme donneur peuvent désactiver; dégrader ou éliminer les facteurs antinutritionnels ou les composés toxiques.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 37. Pour les raisons décrites à la Section 3, des études toxicologiques classiques peuvent ne pas être considérées nécessaires lorsque la substance ou une substance apparentée très proche a, en tenant compte de sa fonction et de son exposition, déjà été consommée dans l'alimentation sans incidents. Dans les autres cas, l'utilisation d'études toxicologiques classiques appropriées ou d'autres études de la nouvelle substance peut-être nécessaire.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 38. Dans le cas de protéines, l'évaluation de la toxicité potentielle devrait se focaliser sur les similarités des séquences d'acides aminés entre la protéine d'une part et les protéines toxiques et les facteurs antinutritionnels (ex: inhibiteurs de protéases, lectines) connus d'autre part, ainsi que sur leur stabilité, à la chaleur, ou au processus de transformation et à la dégradation dans des modèles de simulation représentatifs des conditions gastriques et intestinales. Des études de toxicité orales appropriées[15] peuvent être nécessaires à mener dans le cas où la protéine présente dans l'aliment n'est pas similaire à des protéines précédemment consommées sans incidents dans les aliments, et en tenant compte de sa fonction biologique quand elle est connue.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 39. La toxicité potentielle de substances non protéiques introduites qui n'ont pas été consommées sans incidents dans les aliments devrait être évaluée sur la base du au cas par cas selon l'identité et la fonction biologique de la substance dans la plante et selon l'exposition alimentaire. Le type d'études à réaliser peut inclure des études portant sur le métabolisme, la toxicocinétique, la toxicité subchronique, la toxicité chronique, la carcinogénicité, la toxicité sur la fonction de reproduction et le développement, conformément aux approches toxicologiques traditionnelles.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 40. Cela peut nécessiter l'isolement de la nouvelle substance à partir de la plante à ADN recombiné, ou la synthèse ou la production de cette substance à partir d'une source alternative, auquel cas il devrait être montré que le matériel étudié est équivalent sur le plan biochimique, structurel et fonctionnel à celui produit dans la plante à ADN recombiné.

15 Des lignes directrices pour les études de toxicité orale ont été élaborées dans des instances internationales, par exemple, les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

subchronique pour déterminer le coefficient de sécurité de la consommation en fonction de l'exposition de la population générale.

L'approche conceptuelle de l'évaluation de la toxicité d'une substance introduite est décrite comme suit dans les paragraphes 34 à 40 de la Directive du Codex.

Méthodes utilisées pour déterminer l'absence de toxicité

Les éléments nécessaires et les méthodes utilisées pour déterminer si la nouvelle substance est une toxine ou non sont décrites dans les paragraphes 34 à 40 de la Directive du Codex (voir plus haut). Il faut de grandes quantités de protéines purifiées exprimées par le transgène pour réaliser des études de toxicité. Comme on ne peut pas en obtenir suffisamment dans les tissus végétaux, on extrait habituellement les protéines de micro-organismes (comme *Escherichia coli*) génétiquement modifiés de façon à produire la protéine en grande quantité. Dans ce cas, l'équivalence biochimique et fonctionnelle de la version issue de la bactérie et de la version exprimée par le végétal doit être prouvée.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 10. L'utilisation de modèles animaux pour évaluer les limites toxicologiques est un élément majeur de l'évaluation des risques associés à de nombreux composés tels que les pesticides. Toutefois, dans la plupart des cas, la substance à évaluer est bien définie, de pureté connue, sans valeur nutritive particulière, et l'exposition humaine au composé est généralement faible. Il est par conséquent relativement simple de donner de tels composés à des animaux à des doses d'ordres de grandeur plus élevés que les niveaux d'exposition attendus chez l'homme, afin de déceler les éventuels effets néfastes pour la santé humaine. De cette façon, il est possible, dans la plupart des cas, d'estimer les niveaux d'exposition pour lesquels on n'observe pas d'effets néfastes, et de fixer des niveaux d'ingestion sûrs en appliquant des facteurs de sécurité appropriés.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 11. Les études sur animaux ne peuvent être directement appliquées à l'examen des risques associés avec des aliments entiers, qui sont des mélanges complexes de composés souvent caractérisés par une grande variation de composition et de valeur nutritionnelle. Du fait de leur volume et de leur effet sur la satiété, ils ne peuvent généralement être donnés aux animaux qu'à des doses qui ne sont que de faibles proportions des quantités qui constituent le régime alimentaire chez l'homme. En outre, la valeur nutritionnelle et l'équilibre des régimes alimentaires utilisés est un élément important que doivent prendre en considération les études sur les animaux pour éviter l'induction d'effets néfastes sans rapport direct avec l'aliment en question. Détecter des effets néfastes éventuels et les associer définitivement à une caractéristique particulière de l'aliment peut donc être extrêmement difficile. Si la caractérisation de l'aliment indique que les données disponibles sont insuffisantes pour une évaluation fine de la sécurité sanitaire, des études sur les animaux correctement conçues pourraient être demandées pour les aliments entiers. Quant à savoir s'il est nécessaire d'effectuer des études sur les animaux, il faut pour cela déterminer s'il convient ou non de soumettre des animaux d'expérience à de telles études lorsqu'il est peu probable que celles-ci aboutissent à des données pertinentes.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 12. Compte tenu des difficultés que représente l'application des procédures traditionnelles d'essai toxicologiques et d'évaluation des risques aux aliments entiers, l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés des végétaux alimentaires, plantes à ADN recombiné incluses requiert une approche plus spécifique. D'où le développement d'une approche multidisciplinaire d'évaluation de la sécurité qui prend en compte à la fois les changements souhaités et les changements involontaires qui peuvent se produire dans la plante ou dans les aliments dérivés de celle-ci, en utilisant le concept d'*équivalence substantielle*.

On réalise habituellement des études d'alimentation sur animaux pour établir l'absence de toxicité aiguë ou subchronique. Ces études ont cependant des limites évidentes. Si elles ont été réalisées avec soin et mettent en évidence une absence d'effets sur des paramètres physiologiques déterminés, elles sont certes utiles mais elles ne donnent pas une assurance complète de la sécurité sanitaire car les extrapolations de résultats des animaux à l'homme, sont généralement sujettes à caution. Ces résultats devraient être considérés comme une "confirmation" et une «garantie d'innocuité» et ils sont un élément supplémentaire de l'évaluation globale de la sécurité sanitaire, dans les cas où ils sont garantis.

Les paragraphes 10 à 12 de la Directive du Codex décrivent les avantages et les limites des études sur animaux dont il faut tenir compte lorsque l'on évalue la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné.

Les études sur animaux qui portent sur des aliments entiers plutôt que sur des composants isolés peuvent être appropriées en cas de modifications significatives de la composition de l'aliment dérivé de plantes à ADN recombiné; voir le paragraphe 53 de la Directive du Codex.

Les problèmes éthiques liés aux études sur animaux et la nécessité de ces études doivent être une préoccupation constante pour éviter aux animaux des souffrances inutiles. La Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur les aliments dérivés des biotechnologies, qui a eu lieu en 2000 (*Aspects de la salubrité des aliments d'origine végétale génétiquement modifiés*, Section 4.2, paragraphe 4.2.2) présente une analyse utile de la nécessité de ces études (Encart 6.1).

On considère en général que les études subchroniques chez les rongeurs doivent être menées sur une durée de 90 jours au minimum pour démontrer

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 53. Certains aliments peuvent nécessiter des tests complémentaires. Par exemple, des études d'alimentarité sur animaux peuvent être justifiées pour les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné, si des changements sur la biodisponibilité des nutriments sont attendus ou si leur composition n'est pas comparable à celle d'aliments traditionnels. Les aliments conçus pour améliorer la santé peuvent nécessiter des études nutritionnelles spécifiques, toxicologiques, ou tout autre étude qui soit appropriée. Si la caractérisation de l'aliment indique que les données disponibles sont insuffisantes pour une évaluation complète de son innocuité, des études sur animaux correctement conçues peuvent être demandées sur les aliments entiers.

Encart 6.1. Nécessité d'études chez l'animal (FAO/OMS, 2000)

Si la caractérisation de l'aliment indique que les données disponibles sont insuffisantes pour une évaluation approfondie de la salubrité, il peut être nécessaire de réaliser des études chez l'animal. C'est notamment le cas si l'aliment est censé apporter une contribution alimentaire significative, s'il n'existe pas d'antécédents de consommation du nouveau produit génique ou si la modification affecte plusieurs voies métaboliques.

Quand l'aliment génétiquement modifié diffère de sa contrepartie traditionnelle par la

présence d'un ou de quelques nouveaux gènes et de leurs produits, il est possible d'isoler et d'étudier ceux-ci d'une manière comparable aux tests de toxicité classiques des additifs alimentaires.

Cependant, il est essentiel de s'assurer que le matériel testé est équivalent sur le plan biochimique et fonctionnel, à celui produit dans l'aliment génétiquement modifié. De cette manière, la sensibilité des tests de toxicité est supérieure à celle que l'on obtiendrait si l'on donnait directement aux animaux les produits des plantes génétiquement modifiées et on évite certains artefacts susceptibles de se produire quand on effectue les tests sur des aliments entiers. Mais cette stratégie ne s'applique que si l'analyse détaillée préalable ne révèle pas d'autres modifications significatives que celles attendues. Dans le cas contraire, il est souvent nécessaire de tester l'aliment entier et les études chez l'animal doivent alors porter sur l'aliment tel qu'il est consommé par l'homme. Le type d'étude à mettre en œuvre est à décider au cas par cas. Outre la recherche d'éventuels effets toxicologiques, les études chez l'animal peuvent aussi être nécessaires si la modification génétique affecte directement ou indirectement la concentration ou la biodisponibilité des nutriments.

Quand on estime que des études toxicologiques sont indispensables pour évaluer la salubrité de la consommation à long terme d'un aliment, on considère la plupart du temps qu'une étude subchronique d'une durée de 90 jours est le minimum nécessaire pour démontrer la salubrité de cette consommation. Le cas échéant, on réalisera au préalable une étude pilote de courte durée afin de s'assurer que le régime est bien accepté par les animaux d'expérience et que les taux d'incorporation de l'article à tester sont appropriés, par exemple que le régime témoin, contenant l'élément de référence à un taux équivalent, ne produit pas d'effets dus aux toxiques naturels présents à une concentration normale dans les aliments traditionnels considérés comme salubres. La dose maximum à utiliser pour une étude chez l'animal est la dose la plus élevée que l'on puisse employer sans entraîner de déséquilibre nutritionnel, tandis que la dose minimale doit être comparable à l'apport prévu chez l'homme.

Il faudrait décider au cas par cas de la nécessité d'effectuer des tests toxicologiques

supplémentaires en tenant compte des résultats de l'étude sur 90 jours et d'autres études. Par exemple, si on observe des modifications tissulaires à type de prolifération durant l'étude sur 90 jours, il sera sans doute souhaitable de réaliser une étude de toxicité à plus long terme.

Les tests toxicologiques classiques ont une valeur limitée pour l'évaluation des aliments entiers, notamment des AGM. En se basant sur la quantité maximale d'aliment entier qui peut être utilisée dans des régimes expérimentaux selon les indications ci-dessus, on peut calculer une marge de sécurité tenant compte de l'absence ou de la nature des effets indésirables et de l'exposition humaine vraisemblable. Pour améliorer les protocoles expérimentaux, on proposera une alimentation animale adéquate sur le plan nutritionnel et on évitera de tester les aliments ou produits d'une manière inappropriée.

L'utilisation de biomarqueurs à effets précoces pourrait accroître la valeur diagnostique et la sensibilité des tests de toxicité effectués sur les aliments (Schilter *et al.*, 1996). Mais cette approche comporte un risque de confusion entre effets adaptatifs et effets toxiques.

Encart 6.2. Études toxicologiques sur les aliments issus de la biotechnologie (FAO/OMS, 2000)

Lorsqu'un produit alimentaire issu de la biotechnologie diffère de sa contrepartie traditionnelle par un petit nombre de caractéristiques bien définies, le processus d'évaluation de la sécurité sanitaire peut être ciblé sur ces caractéristiques qui détermineront les tests à effectuer. L'étude toxicologique se focalisera sur ces quelques caractéristiques bien définies. Il est parfois possible d'isoler et d'étudier les différences d'un ou de quelques nouveaux gènes et de leurs produits d'une manière comparable aux tests de toxicité classiques des additifs alimentaires. Pour les tests de toxicité conventionnels de ces nouveaux gènes et de leurs produits, les études de toxicité subaiguë sur 14 jours constituent la norme (OCDE, 1995: Ligne directrice 407). Une substance dont on doit tester la toxicité est généralement administrée à des rats dans le cadre d'une étude standard de toxicité subaiguë sur 14 jours, à une dose reflétant une très large marge de sécurité. La CSENO est la dose maximale qui peut être incorporée à un régime alimentaire expérimental sans que des effets indésirables soient observés, et on peut en dériver un coefficient de sécurité pour l'exposition humaine au produit considéré. Le processus d'évaluation devrait être complété par des études sur l'homme lorsque les études *in vivo* sur animaux ne mettent en évidence aucun effet inattendu ou irréversible[16].

Ces études devraient être réalisées en plusieurs étapes pour examiner la tolérance jusqu'à des doses maximales d'ingestion potentielle, de manière à avoir des études cliniques contrôlées de confirmation avant de mettre le produit sur le marché. Les études sur l'homme devraient être effectuées le plus tôt possible, dans le respect des considérations d'éthique, afin de réaliser des études sur animaux mieux ciblées, plutôt que de large portée et sans intérêt pour la question examinée. Les observations obtenues dans le cadre d'études sur l'homme et sur les animaux peuvent révéler que l'aliment est sans danger par rapport à l'utilisation prévue, ou mettre en évidence des effets inattendus qui devront faire l'objet d'une enquête plus approfondie pour confirmer l'innocuité de l'aliment.

[16] Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur les aliments dérivés des biotechnologies, Topic 6: *Safety testing of food additives and contaminants and the long-term evaluation of foods produced by biotechnology* 29 mai–2 juin 2000.

Encart 6.3. Aspects techniques des études de toxicité subchronique (FDA, 2003)*

Les études de toxicité subchronique sur des rongeurs sont généralement conduites sur 90 jours (3 mois) à 12 mois. Ces études sont habituellement réalisées pour: prévoir les doses appropriées de la substance d'essai pour les études de toxicité chronique futures; déterminer les CSENO pour certains résultats toxicologiques recherchés ou concevoir des études à long-terme sur des rongeurs ou d'autres animaux, axées en particulier sur les organes cibles identifiés. Ces études ne permettent pas de déterminer la cancérogénicité potentielle d'une substance testée.

Il est essentiel que toutes les études de laboratoire non cliniques soit conduites conformément aux lignes directrices internationalement reconnues[17] et aux Bonnes pratiques de laboratoire (BPL)[18]. Les autres facteurs à prendre en considération sont examinées ci-après.

Animaux de laboratoire.
Les soins, l'entretien et les conditions d'hébergement des animaux de laboratoire doivent être conformes aux directives du *Guide for the care and use of laboratory animals.*[19]

Les espèces, les souches et le sexe doivent être choisis en fonction de la sensibilité générale des animaux de laboratoire. La réactivité de certains organes et tissus des animaux d'expérience à la substance toxique testée entre également en ligne de compte lors de la sélection des espèces, souches et sous-souches de rongeurs pour les études de toxicité. On choisira des souches autogames, exogames ou hybrides de rongeurs selon les aspects scientifiques sur lesquels portent les essais. En outre, les animaux de laboratoire devraient provenir de colonies bien caractérisées et en bonne santé, car, d'après des informations récentes, la capacité de survie de certaines souches de rats en captivité serait limitée, et il convient de sélectionner des animaux sur lesquels l'expérience puisse être prolongée pendant toute la durée recommandée.

Les résultats des tests peuvent varier en fonction de l'âge des animaux utilisés, aussi est-il recommandé d'effectuer les tests sur des animaux jeunes et de commencer à administrer les doses immédiatement après le sevrage, après une période d'acclimatation d'au moins 5 jours. Pour les rongeurs, l'âge maximal est de 6 à 8 semaines.

Un nombre égal de mâles et de femelles de chaque espèce et souche devraient être utilisés pour l'étude. Dans le cas d'études de toxicité subchronique, chaque groupe traité et chaque groupe témoin devrait être constitué d'au moins 20 rongeurs de chaque sexe. Ces recommandations sont destinées à garantir qu'un nombre suffisant d'animaux survivront jusqu'à la fin de l'étude pour permettre une évaluation significative des effets toxicologiques.

Il est conseillé de n'avoir qu'un animal par cage, pour les raisons indiquées ci-après.

S'il y a plusieurs animaux dans une cage, il est impossible de déterminer avec précision l'assimilation alimentaire (rapport entre la quantité d'aliments consommés et le gain de poids).

Il est impossible de déterminer si une perte de poids est due à une altération du goût de l'aliment ou à la toxicité de la substance administrée.

Si les animaux ne sont pas dans des cages individuelles, des organes ou des tissus d'animaux moribonds ou morts peuvent être mangés par les autres animaux et perdus.

Les animaux des groupes traités et du groupe témoin doivent être soumis à un régime alimentaire isocalorique, contenant les mêmes niveaux de nutriments (notamment, fibres et micronutriments)[20]. Une mauvaise maîtrise des variables du régime alimentaire peut se traduire par des déséquilibres nutritionnels ou une privation calorique qui peuvent fausser l'interprétation des résultats de l'étude de toxicité et altérer le résultat et la reproductibilité des examens.

Les animaux devraient être assignés aux groupes témoin et aux groupes traités sur la base d'un échantillonnage aléatoire stratifié, de façon à minimiser le biais et à garantir la comparabilité des variables pertinentes entre les groupes traités et le groupe témoin (par exemple poids corporel moyen et gammes de poids corporel). Si l'on veut fonder la randomisation sur d'autres caractéristiques, celles-ci doivent être décrites et justifiées. Les animaux de tous les groupes doivent être intégrés dans l'étude le même jour; s'ils sont trop nombreux, leur intégration sera étalée sur plusieurs jours. Si cette dernière option est choisie, on intègrera chaque jour dans l'étude un nombre prédéterminé d'animaux du groupe témoin et des groupes à traiter de manière à préserver la comparatibilité.

Plan d'expérience
Les animaux devraient être exposés à la substance d'essai sept jours par semaine, pendant au moins 90 jours consécutifs (3 mois).

La voie d'administration de la substance d'essai doit être choisie en fonction du mode normal d'exposition humaine. Le choix d'une autre voie doit être justifié. Les voies d'administration possibles sont les suivantes.

Si l'exposition humaine se fait en principe à travers la consommation d'aliments solides ou d'une combinaison d'aliments solides et liquides, la substance devrait être administrée dans les aliments. Il ne faut pas laisser les animaux choisir ce qu'ils mangent, ni dans le régime alimentaire base, ni dans celui qui contient la substance. Des précautions doivent être prises pour que les procédés employés lors de l'agglomération en granulés, comme le chauffage, n'altèrent pas la substance d'essai.

La substance d'essai peut être administrée dissoute dans l'eau de boisson ou encore en capsules ou par intubation orale (gavage) si l'exposition humaine résulte plus probablement de l'ingestion quotidienne d'une dose élevée unique que de l'ingestion continue de petites doses. L'administration par gavage devrait être réalisée à peu près à la même heure tous les jours, et le volume maximal de la solution que devrait contenir chaque dose devrait être déterminé en fonction de la taille de l'animal. Chez les rongeurs, ce volume ne devrait pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel (0,4 ml/100g de poids corporel s'il s'agit de substances huileuses). Si la quantité administrée doit être répartie en plusieurs petites doses, la totalité doit être absorbée en 6 heures.

(suite)

17 OECD Guideline for the testing of chemicals, repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents, 407, Sept. 1998

18 Principes de bonnes pratiques de laboratoire de l'OCDE Directive 87/18/CEE, Directive 88/320/CEE

19 National Research Council Institute of Laboratory Animal Resources. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, DC, National Academy Press,

20 Nutrient requirements of laboratory animals, 4th Revised Edition, Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture, National Research Council, 1995.

Encart 6.3. (fin)

Groupes de doses
On utilise au moins trois niveaux de dose de la substance d'essai par sexe (un niveau de dose par groupe), mais il est préférable d'en utiliser 4 ou 5. Un groupe témoin concurrent devrait aussi être inclus. Les niveaux de doses appropriés pour les études de toxicité subchronique peuvent être déterminés sur la base des résultats d'études de toxicité aiguë et à court terme.

Sélection des doses de traitement
Dans les études de toxicité, il est conseillé d'utiliser au moins trois niveaux de doses de la substance d'essai et un groupe témoin concurrent. Les trois niveaux de doses devraient être administrés conformément aux lignes directrices suivantes:

- la dose forte devrait être suffisamment élevée pour provoquer une réaction toxique chez les animaux de laboratoire;
- la dose intermédiaire devrait être assez élevée pour déclencher des effets toxiques minimes chez les animaux d'expérience (altérations des niveaux d'enzymes ou léger ralentissement de la prise de poids, etc.);
- la dose faible ne devrait pas engendrer de réponse toxique chez les animaux testés.

Groupes témoins
Un groupe témoin concurrent approprié d'animaux de laboratoire est nécessaire. Dans les études alimentaires, ce groupe témoin reçoit le régime de base.

L'excipient ou le véhicule de la substance d'essai sera administré aux animaux témoins à raison d'un volume égal au volume maximal de l'excipient ou du véhicule que reçoivent les animaux appartenant à tous les groupes de dose. Des informations sur la toxicité de l'excipient ou du véhicule doivent être fournies pour s'assurer qu'il sera sans incidence sur les résultats de l'étude.

Observations et tests cliniques: observations des animaux d'expérience
L'état des animaux doit être observé au moins une ou deux fois par jour pendant toute la durée de l'étude pour détecter des signes généraux d'effets toxicologiques ou pharmacologiques, de morbidité et de mortalité. Les observations sont généralement espacées d'au moins 6 heures. Il convient de tenir pour chaque animal une fiche, sur laquelle on notera le moment de l'apparition des éventuels effets, leurs caractéristiques et leur progression, de préférence à l'aide d'un système de notation. Les évaluations cliniques devraient porter non seulement sur les effets pharmacologiques et toxicologiques généraux, mais aussi sur les troubles neurologiques, les changements de comportement, les dysfonctionnements du système nerveux autonome et les autres signes de toxicité sur le système nerveux. Les symptômes relevés devraient couvrir les observations suivantes (sans que cette liste soit exhaustive) : modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux, des muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions, et de réactions neuro-végétatives. Il convient également de consigner les changements dans la posture et les réactions à la manipulation ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, de comportements stéréotypés ou bizarres. L'apparition de tumeurs devrait aussi être notée, en particulier dans les études à long terme. En cas d'apparition de symptômes toxiques et pharmacologiques au cours d'une étude, il peut être nécessaire d'effectuer des tests cliniques supplémentaires ou des examens post-mortem approfondis.

Poids corporel et ingestion de nourriture
Les animaux d'expérience devraient être pesés au moins une fois par semaine. La consommation de nourriture (ou d'eau si la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson) devrait aussi être mesurée une fois par semaine, tout au long d'une étude de toxicité subchronique.

Tests cliniques
Les tests suivants doivent être réalisés: examen ophtalmologique, profils hématologiques, tests de chimie clinique, analyses d'urine, tests de neurotoxicité et études d'immunotoxicité.

Autopsie et examen microscopique
Tous les animaux testés devraient être soumis aux examens suivants: autopsie générale, pesage des organes, préparation des tissus pour un examen au microscope, examen microscopique, et histopathologie des organes lymphoïdes.

* ***Référence:*** **US FDA.** 2003. *Toxicological principles for the safety assessment of food ingredients: Red Book 2000, Novembre 2003. IV.C.4a. Subchronic toxicity studies with rodents*. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Department of Health and Human Services.

l'innocuité de l'ingestion répétée d'aliments dérivés de plantes à ADN recombiné. La Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur les aliments dérivés des biotechnologies, tenue en 2000 (*Safety testing of food additives and contaminants and the long-term evaluation of foods produced by biotechnology*, page 4) a été l'occasion d'un débat utile sur les études de toxicité subchronique (résumé dans l'Encart 6.2).

Le document de l'United States Food and Drug Administration sur les principes toxicologiques de l'évaluation de la sécurité sanitaire des ingrédients alimentaires (US FDA, 2003) peut aussi être une référence utile pour les aspects techniques des études de toxicité subchronique (voir le résumé dans l'Encart 6.3.).

Études de toxicité chronique

Les études de toxicité chronique comportent l'administration sur une longue période de la substance d'essai, en général dans les aliments ou dans l'eau de boisson, et parfois par gavage. Ces études ont pour objet de détecter d'éventuels effets cumulatifs sur le ou les organe(s) cibles, en se fondant sur la relation dose-réponse. L'opportunité des études de toxicité chronique à long terme devrait être évaluée au cas par cas, et uniquement lorsque les résultats des études sur 90 jours ou d'autres études d'alimentarité indiquent qu'une étude de toxicité devrait être effectuée sur une plus longue période.

Assurance de qualité

Il est essentiel que le processus d'organisation et les conditions dans lesquelles les études de laboratoire sont planifiées, mises en œuvre, vérifiées, enregistrées et rapportées soient conformes aux principes des bonnes pratiques de laboratoire (BPL)[18]. Ces principes s'appliquent aux essais de substances chimiques visant à déterminer leurs propriétés et/ou leur sécurité pour la santé humaine et l'environnement. Dans les études toxicologiques, il est indispensable de s'assurer que les données utilisées pour estimer la sécurité sanitaire sont d'une qualité acceptable pour toutes les parties. Il faut également établir la relation entre les modifications des paramètres physiologiques mesurés et les niveaux de doses des composés testés auxquels les animaux sont exposés. Il est donc primordial d'avoir des données de bonne qualité qui permettent une juste interprétation de la toxicité et une estimation exacte des CSENO des composés testés. A partir de cette interprétation, le coefficient de sécurité peut être défini en estimant les niveaux maximaux auxquels la population humaine peut être exposée sans que des effets nocifs pour la santé soient observés. En outre, si l'on a observé des différences des paramètres physiologiques mesurés dans le cadre des expériences, entre les animaux traités et les animaux non traités, ces écarts doivent faire l'objet d'une analyse statistique afin d'établir leurs limites de confiance.

Références

Doerfler, W. 2000. *Foreign DANN in mammalian systems*. Wennheim, Germany, Wiley-VCH. 181 pp.

FAO/OMS. 2000. *Aspects de la salubrité des aliments génétiquement modifiés d'origine végétale*. Consultation conjointe d'experts FAO/OMS sur les aliments produits par biotechnologie, 29 mai–2 juin 2000, Genève, Suisse. ftp://ftp.fao.org/docrep/nonfao/ae584f/ae584f00.pdf

FAO/OMS. 2000. *Tests de salubrité des additifs et contaminants alimentaires et évaluation à long terme des aliments produits par biotechnologie*. Sujet 6. Consultation conjointe d'experts FAO/OMS sur les aliments produits par biotechnologie, 29 mai–2 juin 2000, Genève, Suisse. ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/Bio-08.pdf

OCDE. 1995. *Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, Ligne directrice 407. Toxicité orale à dose répétée – pendant 28 jours sur les rongeurs*. Paris, Organisation de coopération et de développement économiques. http://www.OCDE.org/dataOCDE/50/18/37478478.pdf

OCDE. 1998. *Série OCDE sur les principes de bonnes pratiques de laboratoire et la vérification du respect de ces principes Numéro 1*. ENV/MC/CHEM(98)17. Paris, Organisation de coopération et de développement économiques. http://www.olis.OCDE.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/env-mc-chem(98)17

OCDE. 2000. *Rapport du Groupe d'étude sur la sécurité des nouveaux aliments destinés à la consommation humaine et animale*. C(2000)86/ADD1. Paris, Organisation de coopération

[18] Voir Note page 31.

et de développement économiques. http://www.olis.OCDE.org/olis/2000doc.nsf/LinkTo/C(2000)86-ADD1

Schilter, B., Holzhäuser, D., Cavin, C. & Huggett, A.C. 1996. An integrated in vivo and in vitro strategy to improve food safety evaluation. *Trends Food Sci. Technol.*, 7: 327–332.

US FDA. 2003. *Toxicological principles for the safety assessment of food ingredients: Red book 2000, November 2003. IV.C.4a. Subchronic toxicity studies with rodents*. Washington DC, USA, United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Department of Health and Human Services.

US National Research Council. 1995. *Nutrient requirements of laboratory animals*, 4th Revised Edition. Washington DC, USA, Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board of Agriculture ●

7. Évaluation de l'allergénicité potentielle (protéines) dans les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné

Allergies alimentaires

Les allergies alimentaires sont des troubles déclenchés par un produit ou un ingrédient alimentaire qui, habituellement, n'engendre pas de tels effets, eux-mêmes provoqués par une réaction anormale du système immunitaire à une ou plusieurs protéines spécifiques présentes dans l'alimentation. Les véritables allergies alimentaires peuvent mettre en jeu plusieurs types de réponses immunitaires (Sampson et Burks, 1996).

Les allergies alimentaires les plus courantes sont induites par des anticorps qui sont des immunoglobulines de classe E (IgE) spécifiques d'un allergène[21]. Les réactions induites par des IgE sont dites d'hypersensibilité immédiate car les symptômes apparaissent entre quelques minutes et quelques heures après l'ingestion de l'aliment incriminé. Les IgE peuvent induire des allergies au pollen, aux spores des moisissures, aux pellicules de la peau des animaux, au venin d'insectes et à d'autres stimuli présents dans l'environnement ainsi qu'à l'alimentation. Les réactions induites par des IgE affectent peut-être 10 à 25% de la population des pays développés (Mekori, 1996).

Les allergies d'origine alimentaire forment une faible fraction des maladies allergiques, puisqu'elles touchent moins de 2,5% de la population dans les pays développés. Les nourrissons et les jeunes enfants sont plus fréquemment sujets à des allergies alimentaires induites par des IgE que les adultes; la prévalence parmi les enfants âgés de moins de trois ans peut atteindre 5 à 8% (Bock, 1987; Sampson, 1990a).

Les véritables allergies alimentaires incluent aussi des réactions à médiation cellulaire qui font intervenir des lymphocytes sensibilisés localisés dans des tissus, plutôt que des anticorps (Sampson, 1990). Dans les réactions induites par des cellules, l'apparition des symptômes se produit plus de huit heures après l'ingestion de l'aliment. Le rôle des aliments dans les réactions à médiation cellulaire n'est pas encore établi avec certitude (Burks and Sampson, 1993) mais la maladie coeliaque[22], également connue sous le nom d'entéropathie d'intolérance au gluten, affecte une personne sur 300 à 3 000, selon sa localisation géographique. Les allergies alimentaires, induites par l'IgE et l'entéropathie d'intolérance au gluten sont traitées par des régimes qui proscrivent la consommation de certains aliments. Comme dans les deux cas, le seuil de déclenchement est une dose faible, il convient de se montrer très prudent pour prescrire des régimes sans danger et efficaces.

La Commission du Codex Alimentarius a publié une liste des aliments allergisants (associés à des réactions induites par l'IgE) les plus courants à l'échelle mondiale, liste qui comprend l'arachide, le soja, le lait, les ?ufs, les poissons, les crustacés, le blé et les noix portées par des arbres. Ces denrées fréquemment allergènes sont à l'origine de plus de 90% de toutes les réactions allergiques modérées à aiguës aux aliments, bien que de nombreuses publications aient mis en évidence plus de 160 produits alimentaires capables de causer des réactions allergiques sporadiques (Hefle *et al.*, 1996).

Les réactions allergiques aux fruits et légumes frais, qui comprennent le «syndrome d'allergie orale» sont également assez répandues (Parker *et al.*, 1990) mais ces aliments ne

21 L'immunoglobuline E (IgE) est un anticorps protéique qui reconnaît un allergène. Elle circule dans le sang et se fixe à la surface de cellules spécifiques (basophiles et mastocytes). La liaison entre une IgE présente à la surface d'une de ces cellules et un allergène provoque la sécrétion de médiateurs chimiques qui déclenchent les symptômes associés aux réactions allergiques.

21 L'entéropathie par intolérance au gluten est un syndrome de malabsorption caractérisé, entre autres, par la maigreur, l'anémie, la diarrhée et les douleurs osseuses.

Tableau 7.1. Séquences de protéines allergènes d'origine végétale[1]

Espèce	*Nom commun*	*Allergène*	*Synonyme/fonction*	*Accession[2]*
Arachis hypogea	arachide	Ara h 1	Clone P41b	L34402
			Clone 5A1	L33402
			Clone P17	L38853
		Lectine d'arachide	Agglutinine	S14765
Bertholletia exceisa	Noix du Brésil	Ber e 1	albumine 2S (gène BE2S1)	X54490
Brassica juncea	Moutarde d'Inde	Bra j IE-L	albumine 2S grande chaîne	S35592
		Bra j IE-S	albumine 2S petite chaîne	S35591
Carica papaya	Papaye	Papaïne		M15203
Glycine max	Soja	Glycinine	Sous-unité A1aBx	X02985
			Sous-unité A2B1a	Y00398
			Sous-unité A3B4	M10962
			Sous-unité G1	X15121
			Sous-unité G2	X15122
			Sous-unité G3	X15123
		béta-Conglycinine	Sous-unité alpha	X17698
			Sous-unité CG4	S44893
		Lectine de soja	Agglutinine de soja	K00821
		Inhiteur de trypsine Kuntz	Sous-type KTi-s	X80039
			Sous-type KTi -a	X64447
			Sous-type KTi -b	X64448
Hordeum vulgare	orge	Hor v 1	alpha-amylase/trypsin inhibitor	S26197
		Hor v 1	Inhibiteur alpha-amylase/trypsine	P32360
Malus domestica	pomme	Mal d 1	Profiline	X83672
Oryza sativa	riz	RAP	Protéine allergène du riz	X66257
		RAG1	allergène 1 du riz	D11433
		RAG2	allergène 2 du riz	D11434
		RAG5	allergène 3 du riz	D11430
		RAG14	allergène 14 du riz	D11432
		RAG17	allergène 17 du riz	D11431
Phaseolus vulgaris	haricot	PR-1	Protéine reliée à la pathogénèse PR1	S11929
		PR-2	Protéine reliée à la pathogénèse PR2	S11930
Sinapis alba	Moutarde blanche	Sin a 1.1	Inhibiteur albumine 2S/amylase	S54101
		Sin a 1.2	Inhibiteur albumine 2S/amylase	PC1247
Triticum aestivum		WGA	Agglutinine A du germe de blé	M25536
		WGA	Agglutinine D du germe de blé	M25537
Triticum durum	Blé dur	WGA	Agglutinine du germe de blé	J02961
Triticum turgidum	blé poulard	Allergène 16K	Inhibiteur de l'alpha-amylase	S19296

[1] *Adaptation de Metcalfe* et al. *(1996).*

[2] *Bases de données du domaine public: GenBank/EM BL/Genpept ver 86.0, SWISSPROT ver 30, PIR ver 41.*

figurent pas sur la liste de la Commission du Codex alimentarius d'une part parce que les symptômes sont généralement modérés et limités à la région oro-pharyngée et d'autre part parce que les allergènes sont thermolabiles et ne résistent pas à la digestion. La liste mentionne aussi des céréales renfermant du gluten (blé, seigle, orge, avoine et épeautre) qui sont impliquées dans l'étiologie de l'entéropathie d'intolérance au gluten. Le tableau 2 présente une synthèse des séquences de protéines allergéniques contenues dans les aliments d'origine végétale, avec leurs numéros d'ordre pour retrouver les séquences dans les bases de données pertinentes.

Presque tous les allergènes alimentaires sont des protéines, bien que d'autres substances alimentaires, telles les haptènes[23] puissent intervenir dans le processus allergique. De même, les protéines de la prolamine du blé, du seigle, de l'orge, etc. contribuent au déclenchement de l'entéropathie d'intolérance au gluten. Si les plantes cultivées qui servent à la production de denrées de base contiennent des milliers de protéines différentes, relativement peu d'entre elles sont allergisantes. La répartition de ces protéines varie entre les différentes parties de la plante et peut être influencée par des facteurs de l'environnement, comme le climat et l'exposition aux maladies. Les techniques de sélection classiques suppriment ou augmentent la diversité des protéines présentes dans l'approvisionnement vivrier, mais elles ont eu peu ou pas d'effet sur le pouvoir allergisant de nos principaux aliments.

Allergénicité potentielle des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné

L'allergénicité potentielle est à prendre en considération quand des protéines sont introduites dans le régime alimentaire par des produits dérivés de plantes à ADN recombiné, surtout s'il n'existe pas d'historique de leur consommation, si la source ne peut pas être facilement identifiée ou s'il s'agit de versions recombinées de protéines provenant de sources différentes. La méthode actuelle d'évaluation de l'allergénicité est présentée à l'Annexe sur l'Évaluation de l'allergénicité potentielle de la Directive du Codex (présentée à l'Annexe 2 du présent document). Comme il n'existe pas de méthodes définitives qui permettent de prédire la relation d'une réaction allergique chez l'homme avec une protéine nouvellement exprimée, le Codex recommande d'utiliser une approche au cas par cas, progressive et intégrée pour évaluer l'allergénicité potentielle des protéines nouvellement exprimées. Cette approche, reproduite dans son intégralité dans les passages qui suivent, prend en compte les preuves provenant de différents types d'information et de données, car aucun critère n'est à lui seul suffisamment prédictif.

La Directive du Codex décrit les méthodes d'évaluation de l'allergénicité, non seulement dans l'Annexe (voir plus haut), mais aussi dans les paragraphes 41 à 43 qui sont mieux explicités ci- dessous.

[23] Les haptènes sont de petites molécules susceptibles d'interagir avec les protéines du corps ou des protéines de l'alimentation et de rendre ces protéines allergisantes.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 41. Quand la ou les protéine(s) résultant du gène inséré est présente dans les aliments, son allergénécité potentielle devrait être évaluée dans tous les cas. Une approche au cas par cas, progressive et intégrée utilisée dans l'évaluation de l'allergénicité potentielle de(s) nouvelle(s) protéines exprimée(s) devrait reposer sur divers critères utilisés en combinaison (puisqu'aucun critère n'est à lui seul suffisamment prédictif pour l'allergénicité ou la non-allergénicité). Comme indiqué au paragraphe 20, les données devraient être obtenues avec des méthodes scientifiques solides. Une présentation détaillée des points à considérer se trouve dans l'Annexe 1 au présent document.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 42. Les nouvelles protéines exprimées dans les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné devraient être évaluées pour tout rôle éventuel dans l'activation d'entéropathies de sensibilité au gluten si le matériel génétique exprimé est obtenu à partir de blé, seigle, orge, avoine, ou de graines de céréales apparentées.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 43. Le transfert de gènes issus d'aliments communément allergéniques et à partir d'aliments connus pour induire l'entéropathie de sensibilité au gluten chez les sujets sensibles devrait être évité à moins que ne soit documenté le fait que le gène en question ne code pas pour un allergène ou pour une protéine impliquée dans l'entéropathie de sensibilité au gluten.

Stratégie d'évaluation de l'allergénicité

Les étapes initiales de l'évaluation de l'allergénicité potentielle de toute protéine nouvellement exprimée consistent à déterminer l'origine de la protéine introduite; toute similitude significative entre la séquence d'acides aminés de la protéine et celle des allergènes connus; ses propriétés structurelles, y

Encart 7.1. Principaux paramètres utilisés dans les évaluations de l'allergénicité

Source de la protéine

En tant qu'élément de données étayant la sécurité sanitaire des aliments issus de plantes à ADN recombiné, l'information devrait décrire tout cas d'allergénicité associée à l'organisme donneur. Les sources allergisantes de gènes seraient définies comme les organismes pour lesquels il existe une preuve raisonnable qu'ils causent des réactions allergiques médiées par les IgE suite à des expositions par la voie orale, respiratoire ou cutanée. Connaître la source de la protéine introduite permet d'identifier les outils et les données pertinents à considérer pour l'évaluation de l'allergénicité. Ceux-ci comprennent: la disponibilité de sérum à des fins de criblage; le type, la gravité et la fréquence des réactions allergiques documentées; les caractéristiques structurelles et la séquence des acides aminés; les propriétés physicochimiques et immunologiques (le cas échéant) des protéines allergéniques connues provenant de cette source.

Homologie de la séquence d'acides aminés

L'objectif de la comparaison des homologies de séquence est d'évaluer à quel point la structure d'une protéine nouvellement exprimée est similaire à celle d'un allergène connu. Cette information peut indiquer si cette protéine a un potentiel allergénique. Les recherches de l'homologie de séquence en comparant la structure de toute protéine nouvellement exprimée avec tous les allergènes connus devraient être effectuées. Ces recherches devraient être menées en utilisant différents algorithmes tels que FASTA ou BLASTP[24], afin de prédire toute similitude structurelle générale. Des stratégies, telles que des recherches par étapes de segments d'acides aminés contigus identiques peuvent être effectuées pour déterminer les séquences qui peuvent constituer des épitopes linéaires. La taille des segments d'acides aminés contigus recherchée devrait être fondée sur une base scientifique justifiée en vue de minimiser la possibilité d'obtenir de faux négatifs ou de faux positifs[25]. Pour obtenir des résultats biologiquement pertinents, il faudrait adopter des méthodes de recherche et d'évaluation validées.

La réactivité croisée des IgE entre une protéine nouvellement exprimée et un allergène connu devrait être considérée comme possible quand il y a plus de 35% d'identité pour un segment de 80 acides aminés ou plus (FAO/OMS 2001) ou selon un autre critère scientifiquement justifié. Toutes les informations résultant de la comparaison de l'homologie de séquence entre la protéine nouvellement exprimée et les allergènes connus devraient être rapportées pour permettre une évaluation scientifiquement fondée au cas par cas.

Les recherches d'homologie de séquence ont certaines limites. En particulier, les comparaisons se limitent aux séquences d'allergènes connus se trouvant dans les banques de données accessibles au public et la littérature scientifique. Il y a également des limites dans la capacité de ces comparaisons à détecter des épitopes non contigus capables de se fixer eux-mêmes spécifiquement aux anticorps IgE.

Un résultat négatif d'homologie de séquence indique que la protéine nouvellement exprimée n'est pas un allergène connu et qu'elle n'est pas susceptible d'avoir une réactivité croisée avec des allergènes connus. Un résultat indiquant l'absence d'une homologie de séquence significative devrait être pris en compte avec l'ensemble des autres données découlant de cette stratégie lorsqu'on évalue le potentiel allergénique de protéines nouvellement exprimées. Des études approfondies devraient être menées lorsque cela s'avère nécessaire (voir aussi plus loin Dépistage avec des sérums ciblés). Un résultat positif d'homologie de séquence indique que la protéine nouvellement exprimée est susceptible d'être allergénique. Si le produit devait être considéré plus avant, il devrait être évalué au moyen de sérum provenant des personnes sensibles à la source allergénique identifiée.

Résistance à la pepsine

La résistance à la digestion par la pepsine a été observée pour différents allergènes alimentaires; il existe donc une corrélation entre la résistance à la digestion par la pepsine et le potentiel allergénique[26]. Par conséquent, la résistance d'une protéine à la dégradation en présence de pepsine sous les conditions appropriées indique qu'il faut mener une analyse plus poussée pour déterminer si la protéine nouvellement exprimée est allergénique. L'établissement d'un protocole de dégradation de la pepsine cohérent et bien validé pourrait améliorer l'utilité de cette méthode. Cependant, il faudrait prendre en compte le fait que l'absence de résistance à la pepsine n'exclut pas que la protéine nouvellement exprimée puisse être un allergène avéré. Bien que le protocole de résistance à la pepsine soit fortement recommandé, il est reconnu que d'autres protocoles de sensibilité aux enzymes existent. Ces autres protocoles peuvent être utilisés lorsque les justifications adéquates sont apportées[27].

Dépistage avec des sérums ciblés

Pour les protéines provenant d'une source allergénique connue, ou qui ont une homologie de séquence avec un allergène connu, des tests immunologiques devraient être effectués lorsque les sérums existent. Les sérums de personnes qui ont une allergie cliniquement reconnue à la source de protéine peuvent être utilisés pour tester la fixation spécifique de la protéine aux anticorps de la catégorie IgE dans des essais *in vitro*. La question critique pour de tels essais sera la disponibilité de sérums humains provenant d'un nombre suffisant de personnes[28]. De plus, la qualité des sérums et la procédure d'essai doivent être normalisées pour donner un résultat de test valide. Pour les protéines provenant de sources non connues pour être allergéniques et qui ne présentent pas d'homologie de séquence avec un allergène connu, un criblage ciblé de sérum, peut être envisagé lorsque ces tests, tels que décrits au paragraphe qui suit, sont disponibles.

Dans le cas d'une protéine nouvellement exprimée dérivée d'une source allergénique connue, un résultat négatif lors d'essais immunologiques *in vitro* ne doit pas être considéré comme suffisant, mais devrait inciter à mener des essais supplémentaires, tels que le recours possible à des tests cutanés et à des protocoles *ex vivo*[29]. Un résultat positif à de tels tests indiquerait un potentiel allergène.

24 FASTA est un logiciel qui utilise la méthode de W. Pearson et D. Lipman (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444–2448, 1988) pour rechercher des similitudes entre une séquence (séquence requête) et un groupe quelconque de séquences (séquence banque de données) (http://fasta.bioch.virginia.edu/). Le programme BLAST (basic local alignment search tool) utilise une stratégie fondée sur la correspondance entre les fragments de séquence, au moyen d'un modèle statistique puissant mis au point par S. Karlin et S. Altschul (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 2264–2268, 1990), pour trouver les meilleurs alignements locaux. BLASTP est le programme BLAST du NCBI pour comparer une séquence de protéines (séquence requête) et une séquence de de protéines de la banque de données. Le programme original BLAST a été développé au NCBI (http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/). Un logiciel distinct, du nom de WU-BLAST est disponible à l'Université de Washington (http://blast.wustl.edu/).

25 On reconnaît que la consultation FAO/OMS 2001 a suggéré de faire passer de 8 à 6 acides aminés les recherches de segments identiques. Plus la séquence de peptides utilisée dans la comparaison progressive est petite, plus il est vraisemblable d'obtenir des faux positifs et, inversement, plus la

compris, sans s'y limiter, sa sensibilité à la dégradation enzymatique; et sa stabilité à la chaleur et/ou aux traitements enzymatique et acide.

Comme aucun test unique ne peut prédire la probabilité d'une réponse IgE humaine suite à une exposition par voie orale, la première étape pour caractériser des protéines nouvellement exprimées devrait être la comparaison de la séquence d'acides aminés et de certaines caractéristiques physicochimiques de la nouvelle protéine exprimée avec celle d'allergènes connus en suivant une méthode reposant sur le poids de la preuve (voir l'encart 7.1 pour une description des principaux paramètres utilisés). Cela nécessitera la purification de toutes nouvelles protéines exprimées chez la plante à ADN recombiné, ou la synthèse ou la production de la substance à partir d'une autre source, auquel cas le matériel devrait être démontré équivalent sur le plan structurel, fonctionnel et biochimique à celui produit chez la plante à ADN recombiné. On accordera une attention particulière au choix de l'hôte d'expression car des modifications post-traductionnelles permises par des hôtes différents (c'est-à-dire les systèmes eucaryotiques versus les systèmes procaryotiques) peuvent avoir un impact sur le potentiel allergénique de la protéine.

Il est important d'établir si la source est connue pour provoquer des réactions allergiques. Les gènes dérivés de sources allergéniques connues devraient être présumés codants pour un allergène, à moins que des preuves scientifiques démontrent le contraire.

Le degré d'exposition à la protéine nouvellement exprimée et les effets des procédés de transformation alimentaire pertinents conduiront à une conclusion générale sur le potentiel de risque pour la santé humaine. À cet égard, la nature du produit alimentaire destiné à la consommation devrait être prise en considération pour déterminer les types de transformation qui seront utilisés et leurs effets sur la présence de la protéine dans le produit alimentaire final.

Comme les connaissances scientifiques et la technologie évoluent, d'autres méthodes et outils peuvent être examinés pour évaluer le potentiel d'allergénicité des protéines nouvellement exprimées dans le cadre de la stratégie d'évaluation. Ces méthodes devraient être scientifiquement solides et comprendre un criblage ciblé de sérum (c'est-à-dire l'évaluation de fixation sur IgE dans le sérum des individus avec des réponses allergiques validées cliniquement pour des catégories d'aliments largement apparentés); la constitution de banques de sérum internationales; l'utilisation de modèles animaux; et l'examen de protéines nouvellement exprimées pour les épitopes des cellules T et les motifs structurels associés aux allergènes..

Références

Anderson, J.A. 1996. Allergic reactions to foods. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, 36: S19–S38.

Astwood, J.D., Leach, J.N. & Fuchs, R.L. 1996. Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotech.*, 14: 1269–1273.

Bock, S.A. 1987. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first three years of life. *Paediatrics*, 79: 683–688.

Burks, A.W. & Sampson, H. 1993. Food allergies in children. *Curr. Prob. Paediatrics*, 23: 230–252.

FAO/OMS. 2001. *Évaluation de l'allergénicité des aliments génétiquement modifiés*, Rapport d'une Consultation mixte FAO/OMS d'experts sur les aliments dérivés des biotechnologies.

séquence de peptides utilisée est grande, plus il est vraisemblable d'obtenir des faux négatifs, ce qui réduit l'utilité de la comparaison. (FAO/OMS, 2001).

26 La méthode décrite dans United States Pharmacopoeia (1995) a servi à établir cette corrélation (Astwood *et al.* 1996).

27 Rapport de la Consultation mixte FAO/OMS d'experts sur l'allergénicité des aliments dérivés des biotechnologies (2001): Section 6.4 «Résistance à la pepsine».

28 Selon le rapport de la Consultation mixte FAO/OMS d'experts sur l'évaluation de l'allergénicité des aliments dérivés des biotechnologies (FAO/OMS,2001), un minimum de 8 sérums pertinents est requis pour atteindre une certitude de 99% que la nouvelle protéine n'est pas un allergène dans le cas d'un allergène majeur. De même, un minimum de 24 sérums pertinents est requis pour atteindre le même niveau de certitude dans le cas d'un allergène mineur. Il est reconnu que ces quantités de sérums peuvent ne pas être disponibles pour des questions de mise à l'essai.

29 La procédure *ex vivo* est décrite comme étant le test de l'allergénicité à l'aide de cultures de cellule ou de tissus provenant de sujets humains allergiques (FAO/OMS, 2001).

Rome, Italie, 22–25 janvier 2001. Rome, Italie. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.

Hefle, S.L., Nordlee, J.A. & Taylor, S.L. 1996. Allergenic foods. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, 36: S69–S89.

Mekori, Y.A. 1996. Introduction to allergic disease. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, 36: S1–S18.

Metcalfe, D.D., Astwood, J.D., Townsend, R., Sampson, H.A., Taylor, S.L. & Fuchs, R.L. 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, 36: S165–S186.

Parker, S.L., Leznoff, A., Sussman, G.L., Tarlo, S.M. & Krondl, M. 1990. Characteristics of patients with food-related complaints. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 86: 503–511.

Sampson, H.A. 1990. Immunologic mechanisms in adverse reactions to foods. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.*, 11: 701–706.

Sampson, H.A. & Burks, A.W. 1996. Mechanisms of food allergy. *Ann. Rev. Nutr.*, 16: 161–177.

Autres ressources

International Food Biotechnology Council and International Life Sciences Institute Allergy and Immunology Institute. 1996. Allergenicity of foods produced by genetic modification. F.M. Clydesdale, ed. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 36.

OCDE. 1997. *Évaluation de l'innocuité des nouveaux aliments: Résultats d'une enquête de l'OCDE sur les banques de sérum destiné à l'expérimentation du pouvoir allergisant et sur l'utilisation des banques de données.* Paris, Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). http://www.olis.OCDE.org/olis/1997doc.nsf/LinkTo/NT00000C6A/$FILE/JT00121603.PDF

Taylor, S. 2002. *Topic 13: Allergenicity*. Consultation conjointe d'experts FAO/OMS sur les aliments produits par biotechnologie. Genève, OMS/FAO ●

8. Analyses de composition en constituants essentiels, évaluation des métabolites, procédés de transformation des aliments et modifications nutritionnelles

Analyse de composition

Les analyses de la composition des aliments portent à la fois sur les éléments bénéfiques et nocifs du régime alimentaire, à savoir les nutriments, les non-nutriments bioactifs, les facteurs anti-nutritionnels, les substances toxiques, les contaminants et autres éléments potentiellement utiles et dangereux. La composition de tout aliment varie en fonction de multiples facteurs, tels que la variété végétale, les conditions de végétation et d'entreposage, le climat, les procédés de transformation, etc. Les résultats des analyses de composition ont principalement une valeur d'estimation ou de point de départ pour une analyse plus poussée, au cas où l'on note des écarts par rapport aux valeurs prévues.

Les éventuels changements dans la composition de la plante à ADN recombiné sont évalués à l'aide d'analyses comparatives entre les nutriments, les facteurs anti-nutritionnels, les substances toxiques et les autres constituants essentiels de la plante cultivée et les éléments constitutifs correspondants d'une plante cultivée appropriée de référence. Les données sur la composition des plantes à ADN recombiné et leur équivalent traditionnel sont obtenues en prélevant des échantillons lors d'essais en champ contrôlés et analysées au moyen de méthodes validées et de techniques statistiques appropriées. Les échantillons sont en principe analysés sur une base aléatoire et selon les mêmes méthodes, pour éviter les biais.

Sur la base de l'analyse comparative, il importe de choisir les nutriments sur lesquels sera axée l'évaluation. Généralement l'évaluation de la sécurité sanitaire d'un aliment prend en considération toutes les variations potentielles de la concentration des constituants essentiels qui ont un impact significatif sur le régime alimentaire, ainsi que les modifications potentielles de la biodisponibilité des principaux éléments nutritifs.

Les données sur les constituants essentiels non différenciables sur le plan statistique, recueillies aussi bien sur la plante cultivée à ADN recombiné que sur son équivalent isogène, cultivé dans des conditions très proches, sont essentielles pour établir l'équivalence substantielle. De plus, les données sur la composition devraient se situer dans la fourchette officielle établie pour les variétés traditionnelles considérées comme sans danger pour la consommation, sur la base d'un historique d'utilisation sans incident.

Lorsque des changements significatifs sont décelés, les méthodes analytiques traditionnellement appliquées à l'évaluation des constituants des denrées alimentaires, telles que protéines totales, graisses, cendres, fibres et micronutriments, peuvent être complétées par d'autres analyses pour identifier la nature des changements observés et déterminer si les écarts constatés peuvent avoir un effet néfaste sur la santé. Les paragraphes 44 à 46 de la Directive du Codex décrivent les principaux éléments à prendre en considération dans les analyses des constituants essentiels et des métabolites des plantes à ADN recombiné.

Il se peut que l'on ne dispose pas de valeurs de référence pour une culture vivrière spécifique. Cela peut être le cas pour des plantes cultivées dont la composition nutritionnelle a été modifiée et /ou pour des plantes cultivées indigènes d'une région déterminée. Dans ces situations, l'évaluation a pour but de réunir des données pour établir un profil de composition. Il

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 44. Des analyses de concentrations des composants clés[30] des plantes à ADN recombiné et, spécialement ceux caractéristiques de l'aliment, devraient être comparées par une analyse équivalente d'un produit traditionnel de référence cultivé et récolté dans les mêmes conditions. Dans certains cas, il peut être nécessaire de considérer la nécessité d'une comparaison complémentaire avec la plante à ADN recombiné cultivée dans les conditions agronomiques prévues (ex: application d'un herbicide). La signification statistique de toute différence observée devrait être évaluée dans le contexte de la gamme de la variation naturelle du paramètre analysé pour déterminer sa signification biologique. Le référentiel utilisé dans cette évaluation devrait être idéalement une lignée parentale la plus proche de l'isogénie. Cela peut ne pas être possible dans tous les cas, et dans ce cas la lignée la plus proche possible devrait être choisie. Le but de cette comparaison, conjointement à une nécessaire évaluation de l'exposition, est d'établir que les substances importantes pour la nutrition ou qui peuvent affecter la sécurité sanitaire de l'aliment n'ont pas été altérées de telle façon qu'elles auraient un impact néfaste sur la santé humaine.

DIRECTIVE DU CODEX, PARAGRAPHE 45. La localisation des sites d'essais devrait être représentative de la gamme de conditions environnementales dans laquelle cette variété de plante est censée être cultivée. Le nombre de sites d'essai devrait être suffisant pour permettre une évaluation précise des caractéristiques de composition dans l'ensemble de ces conditions. De même, les essais devraient être conduits sur un nombre de générations suffisant pour permettre une exposition conforme à la variété des conditions rencontrées dans la nature. Afin de minimiser les effets environnementaux, et pour réduire les effets de variations génotypiques survenant naturellement au sein d'une variété cultivée, chaque site d'essais devrait être répliqué. Un nombre adéquat de plantes devraient être échantillonnées et les méthodes d'analyse devraient être suffisamment sensibles et spécifiques pour détecter des variations des composants clés.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 46. Certaines plantes à ADN recombiné peuvent avoir été modifiées de telle sorte qu'il pourrait en résulter des nouveaux métabolites ou des modifications des niveaux de divers métabolites dans l'aliment. Une attention particulière devrait être portée à l'accumulation potentielle, dans les aliments, de métabolites qui pourraient avoir un effet néfaste sur la santé humaine. L'évaluation de la sécurité sanitaire de telles plantes nécessite l'investigation des niveaux de résidus et de métabolites dans l'aliment et l'évaluation de tout changement dans les profils des nutriments. Lorsque des modifications de niveaux de résidus ou de métabolites sont identifiés dans les aliments, une attention particulière doit être donnée aux impacts éventuels sur la santé humaine en utilisant les procédures classiques d'établissement de la sécurité sanitaire de tels métabolites (ex: procédures pour évaluer l'innocuité des produits chimiques dans les aliments pour la santé humaine).

faut savoir que toutes les méthodes de sélection des végétaux, qu'elles soient classiques ou modernes, peuvent altérer le profil de composition et la valeur nutritionnelle des végétaux ou entraîner des modifications inattendues ou non recherchées des concentrations de diverses substances toxiques ou facteurs anti-nutritionnels naturels[31].

Des changements involontaires des niveaux de nutriments peuvent théoriquement survenir de plusieurs manières. L'insertion de matériel génétique peut perturber ou altérer l'expression de gènes de la plante normalement exprimés. L'expression du gène introduit peut, par le biais de la synthèse des protéines, déclencher une activité enzymatique et un dépassement des valeurs des substrats pour la cible moléculaire prévue; en outre un niveau d'expression élevé de transgènes peut réduire les disponibilités d'acides aminés servant à la synthèse d'autres composés. Enfin, la protéine exprimée ou les niveaux modifiés d'autres protéines ou métabolites pourraient avoir des effets antinutrionnels[32].

En général, pour évaluer les effets (éventuels) d'une protéine nouvellement exprimée dans une plante à ADN recombiné, on sélectionne un certain nombre de paramètres: i) antécédents d'utilisation sans danger de la protéine dans l'aliment; ii) connaissance du mode d'action, par exemple de la fonction enzymatique; iii) digestibilité de la protéine dans des modèles *in vitro*; iv) absence de similitudes entre les séquences d'acides aminés et les séquences contenues dans les banques de données existantes de protéines pharmacologiquement actives, d'allergènes protéiques et de toxines protéiques de mammifères connus; v) niveaux d'expression prévisibles de la nouvelle protéine.

Pour les plantes à ADN recombiné qui n'ont pas été mises au point dans le dessein de modifier leur valeur nutritionnelle, l'analyse de la composition vise à démontrer qu'il n'y a pas eu de changement involontaire dans les niveaux des nutriments, substances toxiques ou facteurs anti-nutritionnels essentiels ou dans la biodisponibilité des nutriments. S'il en est ainsi, le

30 Les nutriments essentiels ou les anti-nutriments essentiels sont les constituants d'un aliment donné pouvant avoir un impact substantiel sur le régime alimentaire. Ils peuvent être des constituants majeurs (nutriments: graisses, protéines, hydrates de carbone; anti-nutriments: inhibiteurs d'enzymes) ou des constituants mineurs (minéraux, vitamines). Les principales substances toxiques sont les composés toxicologiquement significatifs connus et présents naturellement dans la plante, comme les composés dont la toxicité potentielle et les concentrations peuvent voir une influence significative sur la santé (ex: la lasolanine des pommes de terre si sa concentration augmente, le sélénium dans le blé) et les allergènes.

31 International Food Composition Tables Directory, voir la section "autres ressources".

32 Des modifications de l'expression des gènes se produisent aussi avec les méthodes de sélection classiques. On a fait valoir que les changements de composition non intentionnels étaient moins fréquents dans les plantes à ADN recombiné que dans les autres végétaux, en raison du nombre limité de gènes qui sont transférés durant le processus de modification génétique.

remplacement d'un aliment par des produits issus de plantes à ADN recombiné ne devrait pas avoir d'effet néfaste sur la santé ou l'état nutritionnel des consommateurs. Les conséquences pour l'ensemble de la population et pour des sous-groupes spécifiques (par exemple, enfants et personnes âgées) devraient être prises en considération.

On dispose cependant d'informations limitées sur la composition de nombreuses espèces végétales, en particulier sur les profils des facteurs anti-nutritionnels et des protéines naturelles. C'est pourquoi l'analyse de la composition est souvent entravée lorsqu'elle est utilisée pour détecter les effets non intentionnels d'une modification génétique. Il faut développer d'autres méthodes d'analyse qui donnent plus de renseignements dans ces cas-là. Des méthodes plus avancées, comme la technique des empreintes génétiques (ARNm) et l'analyse métabolomique sont à l'étude, mais elles n'ont pas encore été validées pour la détection de différences significatives dans l'expression des gènes et la détermination de l'importance de l'altération, sur le plan toxicologique.

Les métabolites dépendent du profil nutritionnel d'un aliment, qui est évalué en plusieurs étapes: analyse de composition, analyse morphologique et physiologique sous forme de tests *in vitro*, études sur animaux et analyse clinique au moyen d'études sur l'homme. Compte tenu du large éventail de composés pertinents sur le plan nutritionnel et de composés antinutritionnels et toxiques connus qui sont sélectionnés, l'approche analytique ciblée, consistant à mesurer la teneur en substances simples, garantit que des altérations involontaires des voies métaboliques de la plante seront détectées. Lorsque des altérations des métabolites de la plante suscitent des préoccupations sanitaires importantes, ou lorsque leur présence est décelée dans l'aliment dérivé de la plante génétiquement modifiée, l'innocuité de ces métabolites peut être testée individuellement.

Les teneurs en hydrates de carbone, protéines, graisses, énergie et eau sont parmi les principales informations que l'on doit avoir sur les plantes à ADN recombiné (Greenfield and Southgate, 1996). Des données sur les vitamines et minéraux essentiels sont nécessaires lorsque les carences provoquent des maladies ou lorsqu'il s'agit d'aliments dont la composition nutritionnelle a été modifiée.

La teneur en hydrates de carbone (McCleary *et al.*, 2006) peut être mesurée par divers moyens: i) méthodes analytiques, pour mesurer l'amidon total, l'amidon résistant et les fibres alimentaires; ii) méthodes chimiques portant sur la dégradation enzymatique des polysaccharides ou des oligosaccharides en sucres de base; iii) méthodes physiques pour évaluer la structure de l'aliment conservée ou conférée; iv) évaluation des propriétés fonctionnelles, visant à déterminer par exemple si le produit est glycémique, digestible, fermentescible, etc.

La teneur en protéines des aliments nouveaux est déterminée par des analyses des acides aminés, comme la méthode de Kjeldahl ou une méthode similaire (Association of Official Analytical Chemistry, 2002), qui consiste en principe à faire un dosage de l'azote pour en dériver la teneur en protéines[33]. Autrement, compte tenu de leur structure, les protéines peuvent être hydrolysées pour libérer les acides aminés qui les constituent. Ces derniers peuvent ensuite être mesurés par échanges d'ions, chromatographie gaz-liquide ou chromatographie liquide à haute résolution. La somme des acides aminés représente alors la teneur en protéines de l'aliment (en poids).

Presque toutes les graisses présentes dans les aliments sont des triglycérides. Ces graisses sont analysées soit en tant qu'acides gras, et le résultat est alors exprimé en triglycérides, soit en tant que fraction de l'aliment soluble dans des solvants lipidiques.

Procédés de transformation des aliments

Les méthodes de transformation peuvent entraîner une variation significative de la teneur en nutriments d'un aliment, par rapport au profil en nutriments de la plante cultivée, au champ (Morris *et al.*, 2004).

[33] Cette approche repose sur un double postulat: les hydrates de carbone et les graisses alimentaires ne contiennent pas d'azote et presque tout l'azote contenu dans le régime alimentaire est présent en tant qu'acide aminé dans des protéines.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 47. Les éventuels effets de la transformation des aliments, y compris une préparation à domicile, effectuée sur des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné devraient être considérés. Par exemple, des changements peuvent survenir en ce qui concerne la stabilité à la chaleur d'un toxique endogène ou la biodisponibilité d'un élément nutritionnel important après transformation. De ce fait, des informations décrivant les conditions de transformation appliquées dans la production d'un aliment à partir de la plante devraient être fournies. Par exemple, dans le cas d'huiles végétales, des informations devraient être fournies sur le processus d'extraction et les étapes de raffinage consécutives.

Les techniques de séparation modernes, comme la mouture, la centrifugation et le pressage, modifient le contenu nutritionnel des aliments, en préservant certains nutriments et en en supprimant d'autres. Pour compenser la réduction de leur valeur nutritionnelle, les aliments transformés sont souvent "enrichis" ou "fortifiés" en certains nutriments d'importance critique (habituellement, certaines vitamines) qu'ils ont perdus durant la transformation. Malgré cela, les aliments transformés tendent à avoir un profil nutritionnel inférieur à celui des aliments entiers frais, du moins en ce qui concerne la teneur en sucres, amidon, potassium/sodium, vitamines, fibres et acides gras (essentiels) intacts et non oxydés. En outre, ils contiennent souvent des substances potentiellement nocives, telles que graisses oxydées et acides gras trans.

Les procédés thermiques peuvent réduire les concentrations de nombreux nutriments thermolabiles, tels que certaines vitamines et substances phyotchimiques, et sans doute aussi d'autres substances qui n'ont pas encore été découvertes. Par exemple, une pomme de terre que l'on met à bouillir peut perdre une quantité significative de vitamines B et C, en raison d'un échange osmotique entre la pomme de terre et l'eau en ébullition. Des pertes similaires se produisent lorsqu'un aliment est rôti ou frit dans l'huile. Les pertes en nutriments effectives observées varient en fonction de nombreux facteurs, tels que le type d'aliment, le temps et la température de cuisson.

Modification nutritionnelle

Pour les plantes à ADN recombiné mises au point dans le dessein de modifier leur contenu nutritionnel, l'évaluation nutritionnelle vise à démontrer l'absence d'autres changements involontaires dans les niveaux de nutriments, notamment en ce qui concerne leur biodisponibilité.

L'approche adoptée pour évaluer la sécurité sanitaire des produits dont les profils de nutriments ont été intentionnellement modifiés est, en gros, la même que pour les plantes à ADN recombiné de la première génération (OCDE, 2001). Cependant, les différences de

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 48. L'évaluation d'une éventuelle modification de composition des nutriments clés, qui devrait être conduite pour toutes les plantes à ADN recombiné, a déjà été abordée dans les *Analyses de la composition en composants clés*. Toutefois, les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné qui ont subi des modifications afin de modifier intentionnellement leur qualité nutritionnelle ou leur fonctionnalité devraient être soumis à des évaluations nutritionnelles supplémentaires pour évaluer les conséquences de ces changements, et montrer si l'apport en nutriments est susceptible d'être modifié par l'introduction de ce type d'aliments dans les rations alimentaires.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 49. Des informations sur les profils d'utilisation et de consommation connus d'un aliment et de ses dérivés devraient être utilisées pour estimer la consommation probable des aliments dérivés de la plante à ADN recombiné considérée. Le niveau attendu de consommation de l'aliment devrait être utilisé pour évaluer les implications nutritionnelles du profil modifié des nutriments aux niveaux habituel et maximal de consommation. En basant ces estimations sur la probabilité de consommation la plus haute, on apporte la garantie que le potentiel de tout effet nutritionnel indésirable sera détecté. Une attention particulière devrait être portée aux caractéristiques physiologiques particulières et exigences métaboliques de groupes de population spécifiques, tels que les nourrissons, les enfants, les femmes enceintes ou allaitantes, les personnes âgées et celles souffrant de maladies chroniques ou de systèmes immunitaires déficients. Sur la base de l'analyse des impacts nutritionnels et des besoins alimentaires de sous-groupes spécifiques de la population, des évaluations nutritionnelles additionnelles peuvent s'avérer nécessaires. Il est aussi important de vérifier dans quelle mesure l'élément nutritif modifié est biodisponible et reste stable au cours du temps, de la transformation et du stockage.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 50. La pratique de sélection de plantes, incluant les techniques de manipulation *in vitro* des acides nucléiques, pour modifier les niveaux de nutriments dans les plantes cultivées peut induire des changements importants dans le profil des nutriments de deux manières. La modification intentionnelle des composés de la plante peut changer l'intégralité du profil nutritionnel du produit de la plante et ce changement peut affecter le statut nutritionnel des individus qui consomment cet aliment. Des modifications imprévues dans les nutriments peuvent avoir les mêmes effets. Bien que les composés de la plante à ADN recombiné aient été individuellement évalués comme sûrs, l'impact du changement sur le profil général des nutriments devrait être déterminé.

composition entre ces produits et leurs équivalents traditionnels de référence sont généralement plus marquées, de sorte que les risques d'effets non intentionnels sont accrus. En substance, on peut considérer que les méthodes actuellement utilisées pour évaluer la sécurité sanitaire des plantes à ADN recombiné ont une utilité limitée, étant donné que les plantes cultivées qui ont subi des modifications nutritionnelles ne vont pas être équivalentes en substance à leur produit traditionnel de référence et qu'elles auront moins de valeurs de composition communes à comparer.

Les produits dont le contenu ou les propriétés nutritionnelles ont été modifiés peuvent être créés pour répondre à un besoin nutritionnel ou alimentaire spécifique. Toutefois, leur sécurité sanitaire doit être évaluée non seulement pour le groupe cible mais aussi pour les éventuels groupes de population vulnérables, puisque la population n'est pas une entité homogène. Cela suppose d'avoir des données validées sur les profils de consommation des aliments, l'ingestion des nutriments et dans certains cas l'état nutritionnel d'une population ou d'un groupe cible. L'innocuité d'un aliment modifié à des fins nutritionnelles doit être évaluée en prenant en considération l'ensemble du régime alimentaire.

En ce qui concerne les nutriments, les principaux risques sont un changement important de leur concentration, leurs interactions possibles et les effets inattendus. Il est donc parfois nécessaire d'entreprendre des études d'alimentation sur l'animal afin de savoir à quelles conséquences on peut s'attendre quand on modifie leur profil et leur biodisponibilité.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 51. Quand les modifications résultent en un produit alimentaire, comme de l'huile végétale, de composition significativement différente du produit traditionnel de référence il peut être approprié d'utiliser d'autres aliments ou composants alimentaires traditionnels (des aliments ou composants alimentaires dont la composition nutritionnelle est la plus proche de celle de l'aliment dérivé d'une plante à ADN recombiné) comme référentiels appropriés pour évaluer l'impact nutritionnel de l'aliment.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 52. Du fait des variations géographiques et culturelles des profils de consommation alimentaire, des changements nutritionnels associés à un aliment spécifique peuvent avoir un impact plus important dans certaines régions géographiques ou cultures que dans d'autres. Quelques plantes servent de source majeure pour un nutriment particulier chez certaines populations. Les nutriments et les populations concernées devraient être identifiés.

DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 53. Certains aliments peuvent nécessiter des tests complémentaires. Par exemple, des études d'alimentarité sur animaux peuvent être justifiées pour les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné, si des changements sur la biodisponibilité des nutriments sont attendus ou si leur composition n'est pas comparable à celle d'aliments traditionnels. Les aliments conçus pour améliorer la santé peuvent nécessiter des études nutritionnelles spécifiques, toxicologiques, ou tout autre étude qui soit appropriée. Si la caractérisation de l'aliment indique que les données disponibles sont insuffisantes pour une évaluation complète de son innocuité, des études sur animaux correctement conçues peuvent être demandées sur les aliments entiers.

Nouvelles méthodes analytiques

Des méthodologies améliorées et des techniques plus sensibles permettent aujourd'hui de détecter des altérations non intentionnelles de la composition des aliments qui étais jadis impossibles à déceler. L'application de méthodes 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) peuvent donner des indications des changements au niveau de l'expression d'un ARNm, de la production de protéines et / ou du métabolisme sans qu'il soit nécessaire de connaître au préalable les modifications spécifiques des constituants de la plante.

Il reste à démontrer l'utilité et l'applicabilité de ces techniques non-ciblées pour les évaluations des risques, en particulier pour établir et valider la pertinence des changements observés pour la sécurité sanitaire des aliments. L'une des plus grandes difficultés est de différencier les variations naturelles de celles qui résultent de la modification génétique. Il est essentiel que des banques de données des profils des éléments constitutifs de la plante dans des conditions différentes contiennent la gamme complète de valeurs de chaque paramètre mesuré dans des conditions environnementales, génétiques et de développement très diverses. Ces informations devraient être mises en corrélation avec la présence ou l'absence des dangers correspondants pour la sécurité sanitaire des aliments.

Les méthodes de profilage ne sont pas encore adaptées pour les évaluations courantes des risques, et elles doivent encore être développées et validées. Une analyse, guidée par des hypothèses, des catégories pertinentes de composés susceptibles d'être altérés représente probablement une alternative plus prometteuse. Ainsi, les méthodes de profilage ne prétendent pas se substituer aux analyses classiques des composants simples mais elles pourront s'avérer utiles, une fois validées, pour confirmer et compléter d'autres données.

Références

Association of Official Analytical Chemistry. 2002. *Official methods of analysis.* 2002. Washington, DC, Association of Official Analytical Chemistry.

Greenfield, H. & Southgate, D.A.T. 2003. *Food composition data: production, management and use*, 2nd edition.

McCleary, B.V., Charnock, S.J., Rossiter, P.C., O'Shea, M.F., Power, A.M. & Lloyd, R.M. 2006. Measurement of carbohydrates in grain, feed and food. *J. Sci. Food Agric.*, 86: 1648–1661.

Morris, A., Barnett, A. & Burrows, O.-J. 2004. Effect of processing on nutrient content of foods. *CAJANUS,* 37: 160–164.

OCDE. 2001. *Report of the OCDE workshop on the nutritional assessment of novel foods and feeds*. Ottawa, Organisation de coopération et de développement économiques. Feb. 2001. Source: ENV/JM/MONO (2002)6.

Autres ressources

International Life Sciences Institute (ILSI). Crop Composition Database. Une base de données en ligne complète et détaillée sur les plantes cultivées, qui fournit des informations à jour sur la variabilité naturelle de la composition des plantes cultivées traditionnelles et sert de référence pour des analyses comparées de la composition des nouvelles variétés végétales, y compris celles issues des biotechnologies. http://www.cropcomposition.org/

Voir également: ILSI. 2003. Best practices for the conduct of animal studies to evaluate crops genetically modified for input traits. Washington, DC, ILSI Press. http://www.ilsi.org/ AboutILSI/IFBIC/BESTPRACTICES.htm

FAO INFOODS. Le Réseau international des systèmes de données sur l'alimentation (INFOODS) est une initiative ambitieuse, lancée dans le cadre du Programme alimentaire et nutritionnel de l'Université des Nations Unies (UNU) pour améliorer les données sur la composition nutritionnelle des aliments venant de toutes les régions du monde, afin que des données adéquates et fiables puissent être obtenues et interprétées correctement partout dans le monde. http://www.fao.org/infoods/index_fr.stm

OCDE. 1998. Compte-rendu du séminaire de l'OCDE sur les essais toxicologiques et nutritionnels des nouveaux aliments. Paris, Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE).

USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Le Nutrient Data Laboratory (NDL) est chargé de développer la banque de données sur les nutriments du Department de l'agriculture des États-Unis « National Nutrient Database for Standard Reference » sur laquelle se fondent la plupart des bases de données du pays sur l'alimentation et la nutrition, et qui est utilisée pour définir les politiques et la recherche en matière d'alimentation et les programmes de surveillance nutritionnelle. http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search ●

9. Perspectives pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de la prochaine génération de plantes à ADN recombiné

Introduction

Depuis quelques années, les modifications génétiques des nouvelles variétés végétales dont la mise au point est en cours sont plus complexes, avec plus de gènes impliqués et une tendance croissante à altérer les voies métaboliques existantes, voire à en introduire de nouvelles. Ces plantes à ADN recombiné de la seconde génération ont été modifiées à dessein pour exprimer des caractères nouveaux en vue d'améliorer la nutrition et la santé (par exemple, par une teneur accrue en vitamines) ou la qualité des aliments pour animaux. Contrairement aux cultures à ADN recombiné de la première génération, qui n'ont pas été conçues pour altérer leurs propriétés nutritionnelles et dont les caractères monogéniques étaient relativement simples à évaluer du point de vue de la sécurité sanitaire, ces produits de la seconde génération peuvent être créés précisément pour ne pas être équivalents à leurs contreparties traditionnelles. Cela peut compliquer la tâche des évaluateurs de la sécurité sanitaire des aliments destinés à la consommation humaine ou animale issus de ces plantes génétiquement modifiées, dans la mesure où il n'existe pas toujours de produit de référence traditionnel par rapport auquel ils puissent être comparés.

La prochaine génération de plantes génétiquement modifiées sera probablement plus complexe (ce qui pourrait rendre plus floue la ligne de démarcation entre l'alimentaire et le thérapeutique, notamment entre les produits nutraceutiques, les vaccins comestibles et les produits biopharmaceutiques). L'application du concept de l'équivalence substantielle deviendra moins appropriée, et l'évaluation de la sécurité sanitaire de ces produits dépendra vraisemblablement de méthodes d'évaluation supplémentaires ainsi que d'une meilleure compréhension du lien entre la composition de la plante et les effets sur la santé. Il deviendra alors crucial de veiller à ce que l'évaluation de la sécurité sanitaire prenne en compte les besoins alimentaires et les profils de consommation des populations ou sous-groupes de population potentiellement affectés.

Les produits alimentaires qui ont été génétiquement modifiés en vue de les rendre sensiblement différents de leurs produits traditionnels de référence seront probablement examinés avec une attention différente, voire plus grande, que ceux qui ont jusqu'à présent été approuvés par les organismes de règlementation. De nouvelles méthodes d'analyse sont à l'étude pour prévoir et évaluer ces différences (voir Kuiper et Kleter, 2003). Pour l'instant ces méthodes n'ont qu'une utilité limitée car on ne dispose pas de données suffisantes pour dire si les différences statistiquement significatives qui pourraient être décelées à l'aide de méthodes de profilage comme les biopuces à ADN/ARN ou la protéomique, sont pertinentes du point de vue biologique pour la sécurité sanitaire.

A l'échelle internationale, peu d'efforts ont été faits pour tenter de trouver de meilleures approches pour évaluer la sécurité sanitaire des AGM à des fins nutritionnelles et de santé. L'International Life Sciences Institute (ILSI) a publié un document qui présente des données scientifiques et formule des recommandations pour l'évaluation de la sécurité sanitaire et des effets nutritionnels des plantes cultivées dont les qualités nutritionnelles ont été améliorées (les

aliments génétiquement modifiés en vue d'améliorer la santé n'y sont pas traités). Ce document contient des termes et des définitions pour décrire ces produits, identifie les principaux défis en matière de sécurité sanitaire et de nutrition, et présente des approches et des méthodes possibles pour relever ces défis (ILSI,2004). Plus récemment, le groupe intergouvernemental spécial du Codex sur les aliments dérivés des biotechnologies a décidé en 2005 d'entamer de nouveaux travaux pour élaborer une annexe à la Directive de 2003 (voir l'Annexe 2). Cette annexe donnera des éclaircissements supplémentaires sur le texte de la Directive de 2003.

Principes généraux régissant l'adjonction d'éléments nutritifs essentiels aux aliments

La Commission du Codex alimentarius (CAC, 2007) fournit des orientations pour maintenir ou améliorer la qualité nutritionnelle globale des aliments grâce à l'adjonction d'éléments nutritifs essentiels à des fins d'enrichissement, de restitution et d'équivalence nutritionnelle. Les Principes généraux visent également l'adjonction d'éléments nutritifs essentiels aux aliments spéciaux afin d'assurer une teneur appropriée et suffisante en éléments nutritifs. Ils ont été élaborés pour éviter l'adjonction arbitraire d'éléments nutritifs essentiels aux aliments et, partant, réduire les risques qui découlent pour la santé de l'ingestion excessive desdits éléments, ou encore de carences ou d'apports déséquilibrés. Introduits par le Codex en 1987, ces Principes généraux ont par la suite fait l'objet d'amendements. A l'échelle internationale, la question de l'enrichissement des aliments à des fins nutritionnelles ou de santé est mieux comprise. Il s'agit cependant d'un domaine de recherche plus pointu sur le plan scientifique que la création d'une variété végétale dotée d'une résistance accrue à une maladie, aux insectes ravageurs ou aux herbicides, même si l'on utilise à cette fin des outils biotechnologiques, et il requiert un traitement différent.

Dans son examen des principes généraux, la Commission du Codex alimentarius (2007) a centré son attention sur:

1. les nouvelles méthodes d'adjonction ou d'augmentation de la teneur des aliments en éléments nutritifs essentiels, biofortification comprise;
2. la nécessité d'adopter des approches additionnelles pour contrôler l'adjonction d'éléments nutritifs essentiels aux aliments, y compris pour l'enrichissement facultatif;
3. l'adjonction de substances bioactives aux aliments.

Biofortification

Dans l'examen du Codex (2007), la biofortification est définie comme l'adjonction indirecte de nutriments essentiels ou "d'autres substances" aux aliments à des fins d'amélioration nutritionnelle ou sanitaire. Non seulement l'élément nutritif peut être ajouté directement à l'aliment au stade de sa transformation, mais l'enrichissement peut se faire de façon indirecte à un stade antérieur de la production de l'aliment. La technique de transformation génétique par recombinaison de l'ADN permet de le faire, en donnant à la plante ou à l'animal la capacité de produire le nutriment supplémentaire (par exemple, le riz à teneur accrue en béta-carotène – voir encart 9.1).

Sur la base des modèles mis au point par le Canada (Santé Canada, 2005), par la Commission Européenne (CE, 2006), et par Rasmussen *et al.* (2006), on s'efforce actuellement de définir des seuils limites pour l'enrichissement de manière à réduire le risque d'adjonction arbitraire de nutriments essentiels dans les aliments et à pouvoir évaluer leurs effets sur la santé. De même, des recherches plus poussées doivent être entreprises pour déterminer au cas par cas les niveaux minimaux d'adjonction de nutriments à un aliment biofortifié pour aller au-delà de l'effet discernable et atteindre le résultat souhaité, afin de permettre un étiquetage correct et complet du produit.

Le groupe d'experts Independent Science Panel créé en 2003 au Royaume-Uni[34], a examiné la question de la prévention des risques biotechnologiques liés aux aliments

34 http://www.indsp.org/ISPMembers.php

Encart 9.1. Le riz doré

Le «riz doré» mis au point dans un réseau international regroupant l'Union européenne, l'Inde, les Philippines, le Viet Nam et le Bangladesh (http://www.goldenrice.org) est un exemple de plante à ADN recombiné de la nouvelle génération. Les carences en oligo-éléments dans le régime alimentaire, comme l'avitaminose A, sont une source majeure de morbidité (sensibilité aux maladies accrue) et de mortalité partout dans le monde. Cette déficience, qui touche particulièrement les enfants, compromet le système immunitaire, entraîne des troubles de croissance, provoque des maladies et éventuellement la mort. La meilleure façon d'éviter les carences en oligo-éléments est de suivre un régime alimentaire varié, riche en légumes, fruits et produits d'origine animale. Selon l'OMS, de 250 000 à 500 000 enfants deviennent aveugles chaque année parce que leur régime alimentaire ne contient pas suffisamment de vitamine A. Pour les personnes qui vivent en-deçà du seuil de la pauvreté dans de nombreuses régions du monde, la vitamine A doit être fournie par les aliments de consommation courante. Cependant, les plants de riz produisent du â-carotène (provitamine A) seulement dans leurs parties vertes, alors que l'endosperme (partie comestible de la graine) n'en contient pas. Dans le riz doré, des gènes ont été insérés dans le génome du riz par une technique de génie génétique débouchant sur la production et l'accumulation de â-carotène dans les grains. L'intensité de la couleur dorée est un indicateur de la concentration de â-carotène dans l'endosperme. Après la démonstration du concept en 1999, de nouvelles lignées de riz à teneur accrue en â-carotène ont été créées et font actuellement l'objet d'essais en champ. Dans chaque pays, les processus d'analyse des risques et de réglementation s'inscrivent dans le système national et les directives du Codex. Le but est d'arriver à fournir l'apport quotidien recommandé en vitamine A – sous forme de â-carotène – dans 100 à 200g de riz, ce qui correspond à la quantité journalière de riz consommée par les enfants dans les sociétés, comme l'Inde, le Vietnam ou le Bangladesh où cette céréale est l'aliment de base. Dans les autres pays, le riz doré pourrait être un complément d'alimentation précieux pour les enfants, et contribuer à réduire l'incidence des maladies cliniques et subcliniques liées à une déficience en vitamine A. Le *riz doré* ne crée pas de nouvelles dépendances ni de désaffection pour la cuisine traditionnelle et il peut protéger un grand nombre de personnes contre ces maladies.

Encart 9.2. Traits saillants de la prévention des risques biotechnologiques pour les aliments et les plantes cultivées dont les qualités nutritionnelles ont été renforcées

a) Estimation des profils de distribution de l'exposition potentielle: comment déterminer les profils de distribution de l'exposition potentielle dans les groupes de population ciblés et non ciblés d'un pays et évaluer l'innocuité de cette exposition dans les groupes vulnérables. Bien qu'il existe des techniques de modélisation permettant de simuler ces profils, les enquêtes et les essais cliniques comparatifs, d'abord sur des animaux, puis sur des humains consentants et informés, semblent irremplaçables. Dans cette perspective, l'étiquetage des aliments issus des biotechnologies mis sur le marché est un aspect important pour identifier les AGM dans des études épidémiologiques, dans le cadre de la surveillance et de l'évaluation des risques après la mise en circulation des produits.

b) Biodisponibilité: une analyse de la biodisponibilité devrait être intégrée dans les examens règlementaires de toutes les plantes à ADN recombiné mises au point en vue d'améliorer la nutrition ou la santé. Il a été recommandé de réaliser des études sur la biodisponibilité au moyen de cultures cellulaires avant d'effectuer des essais sur animaux, et d'utiliser des composés radiomarqueurs pour suivre le devenir du nutriment sur le métabolisme dans une cellule (Wood et Tamura, 2001).

c) Limites supérieures d'apport: Il est indispensable de fixer des limites supérieures d'apport sans danger du nutriment ou de la substance bioactive pour éliminer tout risque associé à une ingestion excessive. Pour les aliments dont le contenu nutritionnel a été amélioré, des limites supérieures doivent être fixées pour chaque nutriment ciblé car ils ont tous des limites maximales différentes d'ingestion sûre par l'organisme humain. Les plantes à ADN recombiné dont le contenu nutritionnel a été modifié doivent être clairement identifiées et des efforts doivent être faits pour éviter qu'elles ne soient utilisées sans le consentement en connaissance de cause des intéressés. Les limites supérieures d'ingestion sûre doivent être établies pour l'élément nutritif ciblé sous sa forme pure, puis pour les denrées alimentaires sous leur forme comestible, d'abord sur des animaux, puis sur des volontaires humains.

d) La stabilité des nouvelles protéines introduites dans la plante cultivée à ADN recombiné utilisée comme aliment doit être testée car les nouveaux produits peuvent engendrer des sous-produits toxiques inattendus, en particulier si le végétal primaire est transformé en différents produits et préparations. Si le comportement de ces protéines n'est pas connu à partir d'autres sources d'aliments, il doit être analysé durant la transformation et le stockage, ces tests s'ajoutant aux essais de toxicité du produit.

transgéniques nutritionnellement enrichis, en réponse au questionnaire élaboré par le Codex sur les aliments dérivés d'organismes à ADN recombiné modifiés à des fins nutritionnelles et de santé. L'encart 9.2 décrit quelques-uns des traits saillants de la prévention des risques biotechnologiques pour les aliments et les plantes cultivées nutritionnellement enrichis.

Références

Codex Alimentarius. 2006. *Rapport de la cinquième session du groupe intergouvernemental spécial du Codex sur les aliments dérivés des biotechnologies (Alinorm 06/29/34)*. Rome, Codex alimentarius.

Commission du Codex alimentarius (CAC). 2007. *Rapport du groupe de travail sur l'avant-projet d'annexe à la directive régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire*

des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné: Evaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné modifiées à des fins nutritionnelles et de santé. Rome, CL 2007/18-FBT.

Commission européenne (CE). 2006. *Discussion paper on the setting of maximum and minimum amounts for vitamins and minerals in foodstuffs*. Bruxelles, Direction générale de la santé et des consommateurs.

Santé Canada. 2005. *Adjonction de vitamines et de minéraux aux aliments – Politique et plans de mise en œuvre proposés par Santé Canada*. http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/nutrition/foritfication_final_doc-fra.pdf

International Life Sciences Institute (ILSI). 2004. Nutritional and safety assessment of foods and feeds nutritionally improved through biotechnology. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 3: 38–104.

Kuiper, H. & Kleter, G. 2003. The scientific basis for risk assessment and regulation of genetically modified foods. *Food Sci. Tech.*, 14: 277–293.

Rasmussen, S.E., Andersen, N.L., Dragsted, L.O. & Larsen, J.C. 2006. A safe strategy for addition of vitamins and minerals to foods. *Eur. J. Nutr.*, 45: 123–135.

Wood, R.J. & Tamura, T. 2001. Methodological issues in assessing bioavailability of nutrients and other bioactive substances in dietary supplements: summary of workshop discussion. *J. Nutr.*, 131(4 Suppl): 1396S–1398S ●

10. Communication sur les risques entre les parties prenantes

Introduction

La communication sur les risques est un des trois volets, distincts mais intimement liés, de l'analyse des risques, tels que définis par la Commission du Codex alimentarius[35]. C'est «l'échange interactif, tout au long du processus d'analyse des risques, d'informations et d'opinions sur les risques, les facteurs liés aux risques et les perceptions des risques, entre les responsables de leur évaluation et de leur gestion, les consommateurs, l'industrie, les milieux universitaires et les autres parties intéressées, et notamment l'explication des résultats de l'évaluation des risques et des fondements des décisions prises en matière de gestion des risques». Avec l'analyse des risques et la gestion des risques, la communication sur les risques fait partie intégrante de l'ensemble de l'analyse des risques d'un aliment dérivé de plantes à ADN recombiné. La communication sur les risques est la discipline qui permet de comprendre les risques scientifiques et technologiques et d'apprendre à les communiquer au sein d'une structure socio-politique (Powell, 2000).

Les processus adoptés pour évaluer les risques présumés pour la santé et la sécurité de l'environnement et les méthodes permettant de les gérer doivent être communiqués de manière simple et complète sans entrer dans des détails technologiques. Il est important expliquer clairement aux intéressés que si une plante cultivée génétiquement modifiée possède un gène bactérien codant pour une protéine spécifique, cela ne veut pas dire que la plante cultivée transformée abritera elle-même la bactérie, mais seulement qu'elle est maintenant capable, à partir de sa propre physiologie, de produire la nouvelle protéine en utilisant le gène qui était à l'origine présent dans la bactérie. Une fois ce postulat établi, la communication devrait être centrée sur les divers processus de réglementation visant à garantir que la technologie puisse être déployée sans danger et procurer des avantages aux utilisateurs finals.

Caractéristiques essentielles de la communication sur les risques

Selon la Commission du Codex Alimentarius (2003), dans le processus de l'analyse des risques, la communication sur les risques devrait présenter les caractéristiques suivantes:

La principale fonction de la communication sur les risques devrait être de garantir que toutes les informations et les opinions nécessaires à une gestion efficace des risques soient prises en compte dans le processus de prise de décision. La communication devrait notamment expliquer de façon transparente la politique d'évaluation des risques et l'évaluation des risques, notamment les incertitudes. Elle devrait aussi indiquer clairement la nécessité d'adopter des normes ou des textes apparentés spécifiques, ainsi que les procédures suivies pour les définir, notamment la manière dont l'incertitude a été traitée. Elle devrait faire état de toutes les contraintes, incertitudes et hypothèses et de leur incidence sur l'analyse des risques, ainsi que des opinions minoritaires qui ont été exprimées au cours de l'évaluation des risques. Cependant, même si ces informations sont en principe transparentes et accessibles à toutes les parties

35 *Principes de travail pour l'analyse des risques destinés à être appliqués dans le cadre du Codex alimentarius* (adoptés par la Commission du Codex Alimentarius, à sa 26ème Session, 2003; Manuel de Procédure de la Commission du Codex Alimentarius; 13ème édition).

Encart 10.1. La communication sur les risques dans le processus de l'analyse des risques

1. promouvoir la prise de conscience et la compréhension des enjeux spécifiques pris en compte pendant l'analyse des risques;
2. promouvoir la cohérence et la transparence dans la formulation des options et des recommandations de gestion des risques;
3. fournir une base solide pour la compréhension des décisions de gestion des risques proposées;
4. améliorer l'efficacité et l'efficience globales de l'analyse des risques;
5. renforcer les relations de travail entre les participants;
6. favoriser la compréhension du public afin de renforcer la confiance dans la sécurité de l'offre alimentaire;
7. promouvoir l'implication appropriée de toutes les parties intéressées;
8. échanger des informations relatives aux préoccupations des parties intéressées sur les risques associés aux aliments.

intéressées, il convient de mettre à disposition les informations sur l'analyse des risques tout en respectant l'éventuel souci légitime de préserver la confidentialité.

La communication sur les risques est un élément important des procédures de prévention des risques biotechnologiques qui garantit l'acceptation par le public des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné. Il est crucial, pour rassurer les parties prenantes, de communiquer et d'interagir avec le grand public au sujet des risques et des mesures spécifiques qui ont été prises pour les atténuer avant que l'on commence à cultiver la plante à ADN recombiné ou que l'aliment qui en est dérivé soit mis sur le marché. Ce mécanisme permet aussi d'instaurer progressivement la confiance parmi les parties prenantes, tout au long des différentes phases de la mise au point de la plante à ADN recombiné et des aliments qui en sont dérivés. Sans ce canal de communication, on perdrait une occasion d'informer les parties prenantes des efforts accomplis par les responsables de la règlementation pour réduire les risques qui ont été évalués pour la technologie considérée, et on favoriserait la diffusion de rumeurs infondées par des personnes mal informées, ou de messages trompeurs.

Les articles de la presse sur les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné peuvent être polarisés sur la sécurité sanitaire plutôt que sur le risque; sur les progrès de la science plutôt que sur ses débordements; sur la compétitivité plutôt que sur la sécurité sanitaire (Powell et Leiss, 1997). L'analyse des médias est un instrument utile pour comprendre comment se forme l'opinion publique et découvrir ce que les gens disent et ce qu'on leur a dit. Cette étude des moyens d'information permet de se faire une idée du sens des réalités du public (Nelkin, 1987) et de leur perception des risques ou des avantages.

La communication sur les risques est articulée autour de deux éléments principaux: les aspects techniques qui englobent les dangers scientifiques mis en évidence au cours de l'évaluation des risques et les options de gestion découlant de l'évaluation; et les aspects non-techniques qui incluent les protocoles administratifs et les considérations éthiques et culturelles dans la société, tels qu'ils sont traités par les organismes de réglementation durant le processus de l'analyse des risques.

Communication règlementaire sur les risques

La communication règlementaire sur les risques prévoit tout d'abord de tenir les groupes de parties prenantes (sur l'ensemble de la filière alimentaire, c'est-à-dire: scientifiques, agriculteurs, commerçants, transformateurs, obtenteurs, intervenants du marché (détaillants) et consommateurs) informés de l'apparition d'une nouvelle technologie concernant une culture spécifique dès l'approbation du projet relatif à sa mise au point, par l'institution compétente. A partir de là, des méthodes doivent être conçues pour transmettre l'information sous une forme compréhensible tout au long des stades d'élaboration du produit jusqu'à sa mise sur le marché, de façon à mettre en confiance les parties prenantes principales à chaque stade.

Il est important de ne donner que des informations exactes, car la communication sur les risques tend à influencer les croyances psychologiques et culturelles. L'évaluation des risques scientifiques doit être accompagnée d'activités appropriées de gestion des risques et de communication fondées sur la recherche, pour fournir aux consommateurs, aux medias et aux autres intéressés une évaluation équilibrée et scientifiquement fondée des avantages et des risques potentiels d'une technologie particulière, et influencer positivement les décisions des

PRINCIPES DU CODEX PARAGRAPHE 22. Une communication efficace sur les risques est essentielle durant toutes les phases de l'évaluation et de la gestion des risques. C'est un processus interactif qui implique toutes les parties concernées, y compris le gouvernement, l'industrie, les milieux universitaires, les médias et les consommateurs

PRINCIPES DU CODEX PARAGRAPHE 23. La communication sur les risques devrait inclure des processus décisionnels transparents d'évaluation de la sécurité sanitaire et de gestion des risques. Ces processus devraient être totalement documentés à toutes les étapes et ouverts à la vérification publique, tout en respectant les préoccupations légitimes quant à la confidentialité des informations commerciales et industrielles. En particulier, les rapports préparés sur les évaluations de la sécurité sanitaire et les autres aspects du processus de décisions devraient être disponibles pour toutes les parties intéressées.

PRINCIPES DU CODEX PARAGRAPHE 24. Une communication efficace sur les risques devrait inclure des processus de consultation réceptifs. Ces processus de consultation devraient être interactifs. Les points de vue de toutes les parties intéressées devraient être recherchés et les questions pertinentes de sécurité sanitaire des aliments et de nutrition soulevées durant cette consultation devraient être prises en compte pendant le processus d'analyse des risques.

pouvoirs publics. La grande difficulté est de tenir compte des perceptions du public dans la formulation des politiques, sans enlever à la science son rôle prépondérant.

Les passages ci-après des Principes du Codex pour l'analyse des risques liés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes (voir l'Annexe 1) traitent de la communication sur les risques.

La communication sur les risques sert à expliquer comment et pourquoi les décisions sont prises. Elle prend notamment acte de toutes les préoccupations exprimées par les parties prenantes, y compris le public, et explique comment les problèmes soulevés ont été traités. La communication sur les risques est donc un échange itératif entre les parties intéressées et les parties affectées, qui porte principalement mais pas seulement sur les risques. Dans la pratique, compte tenu de la multiplicité des parties prenantes impliquées dans la biotechnologie agricole, la communication sur les risques est dans une large mesure un dialogue non-technique sur les risques réels et perçus.

Il est largement admis que l'on pourrait et devrait faire davantage pour divulguer les informations concernant la sécurité sanitaire des nouveaux aliments, d'autant plus que la salubrité des aliments dérivés des plantes à ADN recombiné est une question qui préoccupe de plus en plus le consommateur. Les pays de l'OCDE et les organisations intergouvernementales sont à la recherche de nouveaux moyens pour partager leurs expériences. Ils s'efforcent de promouvoir la diffusion de l'information et d'aider les consommateurs à bien comprendre les questions de sécurité sanitaire (OECD, 2000). Un certain nombre de pays ont adopté des mesures pour favoriser les échanges d'informations sur l'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM avec le public. Ils ont notamment décidé de:

a. inviter le public à faire des commentaires sur des rapports contenant des évaluations de sécurité sanitaire par des organismes d'évaluation scientifiques;
b. dévoiler les données utilisées pour les évaluations de sécurité sanitaire à l'appui des demandes;
c. publier les résultats des réunions des organismes d'évaluation de la sécurité sanitaire.

Les organismes de réglementation se sont activement engagés et consultent le public sur la sécurité sanitaire des aliments et sur sa règlementation. Certains de ces organismes appliquent une politique de dévoilement de toute l'information contenue dans les demandes d'autorisation (à l'exception de l'information commerciale confidentielle). L'internet est de plus en plus utilisé pour divulguer au public les informations sur l'évaluation de la sécurité sanitaire et les procédures d'approbation. C'est une bonne source d'information sur les plantes cultivées et les autres produits alimentaires qui ont été approuvés. Certains pays étudient les possibilités d'utiliser l'Internet pour diffuser à un plus large public les détails des dossiers de demande afin de rendre le processus d'évaluation aussi ouvert, transparent et accessible à tous que possible.

Le site BioTrack en ligne de l'OCDE (http://www.oecd.org/ehs/service.htm) est une source d'information précieuse sur l'évolution des règlementations dans les États Membres. On y trouve des renseignements sur les ministères ou les agences responsables ainsi que des informations détaillées sur les lois, les règlements ou les lignes directrices. Il y a également deux bases de données importantes: une sur les produits qui ont été commercialisés et l'autre sur les essais en champ de plantes génétiquement modifiées, qui ont été effectués dans des pays de l'OCDE.

La communication sur les risques: un processus de dialogue

La communication règlementaire sur les risques fournit des informations sur le cadre règlementaire et les processus mis au point pour évaluer et gérer les risques, tels que la formulation des politiques, les processus de demande, la participation des parties prenantes, les décisions spécifiques aux produits, et l'accès aux informations utilisées pour éclairer la prise de décision en matière de règlementation. Afin d'éviter des conflits d'intérêt réels ou perçus, de nombreux organismes de réglementation se cantonnent aux activités liées à la communication sur les risques, laissant à d'autres parties prenantes les activités de communication plus technologiques ou plus spécifiques aux produits. Il faut déployer autant d'effort pour recueillir les apports et les impressions des intéressés que pour divulguer l'information.

Pour être efficaces, les communicateurs doivent concevoir des mécanismes appropriés pour recevoir des informations en retour, les analyser et les utiliser en vue de revoir et d'améliorer la portée de leurs messages. Les informations en retour et les apports des parties prenantes permettent aux instances de règlementation et aux évaluateurs des risques d'identifier les préoccupations des parties prenantes et d'agir en conséquence. Souvent le moyen le plus efficace pour assurer la diffusion de l'information implique de renforcer les canaux existants. Par exemple, si les gouvernements publient des mises à jour dans les journaux locaux, elles seront surtout utiles à court terme pour communiquer les risques liés aux biotechnologies agricoles. Cependant, si les gouvernements comptent uniquement sur des mécanismes du type gazettes officielles, qui sont mal distribuées, pour informer le public, on devra se tourner vers d'autres mécanismes pour diffuser l'information aux groupes cibles et recevoir leurs avis.

La crédibilité d'un processus de communication est souvent garantie par la fourniture d'études techniques du processus, facilement compréhensibles. On peut par exemple faire réaliser des études expliquant les sciences et technologies utilisées dans le processus et les procédures de réglementation correspondantes (Beever et Kemp, 2000).

Les différents publics ou groupes de parties prenantes ont des besoins différents, d'où l'importance de comprendre un public bien avant de concevoir une communication qui lui est destinée. L'identification des besoins, des préoccupations, du niveau de connaissance, des opinions et des mécanismes de communication préférés du public visé, grâce à des consultations, facilite le développement d'un style de communication efficace.

Il convient aussi d'examiner avec attention le type de public pour sélectionner les meilleurs communicateurs. Pour être efficaces, les communicateurs doivent être crédibles et fiables, et une même personne n'est pas forcément adaptée à tous les groupes cibles. En outre, les communicateurs doivent avoir d'excellentes aptitudes d'expression orale et d'écoute. En général, la crédibilité des communicateurs dépend des contextes culturels et varie selon les sociétés et les secteurs.

Les deux grandes questions auxquelles il faut répondre au cours d'une communication sur les risques sont les suivantes: «Les aliments dérivés des plantes à ADN recombiné sont-ils sans danger?» et «Quels sont les aliments qui ont été génétiquement modifiés?». Cela soulève la question du choix et de la reconnaissance du type d'aliments dérivés de plantes à ADN recombiné que l'on peut trouver sur le marché. Pour répondre à ces questions, les organismes de réglementation diffusent généralement des informations sur le cadre de réglementation

Encadré 10.2. Considérations utiles pour la communication sur les risques

Bien cerner le public
Il importe, lors de la formulation des messages comportant communication des risques, d'analyser le profil des destinataires afin de comprendre leurs motivations et leurs opinions. En d'autres termes, il convient d'étudier le public auquel on s'adresse, non seulement d'une manière générale, en tant que groupe, mais, dans toute la mesure du possible, en considérant les individus qui le composent, afin de saisir ses préoccupations et ses sentiments et de maintenir une voie de communication ouverte avec ses membres. En effet, l'écoute attentive de toutes les parties intéressées constitue un volet important de la communication des risques.

Impliquer les experts scientifiques
Dans leurs fonctions d'évaluateurs des risques, les experts scientifiques doivent être capables d'expliquer les concepts et les processus auxquels ils ont recours. Ils doivent être en mesure d'expliquer les résultats de leur évaluation ainsi que les données scientifiques, les hypothèses et les jugements subjectifs sur lesquels elle se fonde, afin que les gestionnaires du risque et les autres parties intéressées aient une compréhension claire des enjeux. Ils doivent en outre être capables d'indiquer clairement ce qu'ils savent et ce qu'ils ne savent pas et d'expliquer les incertitudes liées au processus d'évaluation. Par ailleurs, il faut que les gestionnaires du risque soient capables d'expliquer la manière dont ils parviennent aux décisions.

Faire appel à des experts en communication
Une bonne communication des risques suppose que l'on sache présenter des informations compréhensibles et utiles à toutes les parties intéressées. Il se peut que les gestionnaires du risque et les experts techniques ne disposent pas du temps ou des qualifications nécessaires à l'accomplissement de tâches complexes de communication des risques, telles que répondre aux besoins de différents publics (consommateurs en général, secteur industriel, médias, etc.) et préparer des messages efficaces. C'est pourquoi il importe d'obtenir, le plus tôt possible, l'intervention de personnes expertes en la matière. Ce savoir-faire aura été acquis, selon toute probabilité, au moyen de la formation et de l'expérience.

Constituer une source crédible d'information
Les informations provenant de sources crédibles ont plus de chances que les autres d'influencer la perception du public à l'égard du risque. La crédibilité accordée à une source par un public cible peut varier en fonction de la nature du danger, du contexte culturel, social et économique, ainsi que d'autres facteurs. Si le message a plusieurs sources et que sa forme est homogène, sa crédibilité s'en trouve renforcée. Les facteurs qui déterminent la crédibilité de la source sont, notamment, une compétence ou un savoir-faire reconnu, la fiabilité, l'équité et l'objectivité. À titre d'exemple, les termes que les consommateurs associent à une crédibilité élevée sont: factuel, bien informé, expert, bien-être public, responsable, franc et loyal et bonnes réalisations à son actif. Il importe de cultiver la confiance et la crédibilité, qui risquent d'être érodées, voire perdues, en cas de communication inefficace ou inappropriée. Les consommateurs consultés dans le cadre d'études ont indiqué que la méfiance et la faible crédibilité sont le résultat de l'exagération, de distorsions et de la perception d'un intérêt personnel.

Le communicateur efficace reconnaît la réalité des problèmes de l'heure, se montre ouvert quant au contenu et à la démarche et intervient en temps opportun. L'opportunité des messages est en effet de la plus haute importance, étant donné que nombre de controverses finissent par être polarisées sur la question «Pourquoi ne pas l'avoir dit plus tôt?», et non sur le risque lui-même. En outre, les omissions, les distorsions et les déclarations intéressées ne peuvent, à long terme, que nuire à la crédibilité.

Partager la responsabilité
Les organismes réglementaires gouvernementaux opérant aux niveaux national, régional et local ont une responsabilité fondamentale en matière de communication des risques. Le public s'attend à ce que le gouvernement assume la responsabilité principale de la gestion des risques pour la santé publique. Cela est vrai lorsque la décision en cause implique des contrôles réglementaires ou volontaires, mais c'est tout aussi vrai lorsque la décision gouvernementale consiste à ne prendre aucune mesure. Dans ce dernier cas, la communication reste essentielle, puisqu'il s'agit de justifier l'option jugée la meilleure, à savoir ne pas agir. Afin de comprendre les préoccupations du public et de s'assurer que les décisions en matière de gestion des risques répondent de façon adéquate à ces préoccupations, le gouvernement doit déterminer dans quelle mesure le public est informé et ce qu'il pense des différentes options prises en considération.

Les médias jouent un rôle essentiel dans le processus de communication et, de ce fait, partagent ces responsabilités. La communication concernant les risques immédiats pour la santé humaine, en particulier lorsque les conséquences pour la santé pourraient être graves, comme dans le cas de maladies d'origine alimentaire, ne saurait être traitée de la même manière que les préoccupations moins immédiates en matière de sécurité sanitaire des aliments. Quant au secteur industriel, il a également une responsabilité en matière de communication des risques, notamment lorsque ceux-ci découlent de ses produits ou de ses processus. Toutes les parties impliquées dans le processus, à savoir les autorités gouvernementales, le secteur industriel et les médias, ont une part de responsabilité dans le résultat de cette communication, même si les rôles respectifs peuvent différer. Étant donné que la prise de décision doit avoir un fondement scientifique, toutes les parties impliquées dans le processus de communication doivent être au fait des principes et des données de base qui étayent l'évaluation du risque ainsi que des politiques qui sous-tendent les décisions relatives à sa gestion.

Établir une distinction entre données scientifiques et jugements de valeur
Il est essentiel, lors de l'examen des options en matière de gestion des risques, de distinguer les «faits» des «valeurs». Au niveau concret, il est utile de dresser un bilan des faits connus et de les communiquer, tout en expliquant quelles sont les incertitudes associées aux décisions de gestion du risque qui seront proposées ou mises en œuvre. Le communicateur des risques a donc la responsabilité d'expliquer ce qui a été établi de façon factuelle et de bien définir les contours de cette connaissance. La notion de niveau acceptable de risque relève en partie d'un jugement de valeur. En conséquence, les communicateurs des risques doivent être en mesure de justifier le niveau de risque acceptable vis-à-vis du public. Pour un grand nombre de personnes, un aliment «sûr» est un aliment qui ne comporte strictement aucun risque, notion bien souvent inaccessible. En pratique, lorsqu'un aliment est déclaré «sûr», cela signifie qu'il présente une innocuité relative. Bien préciser cet aspect constitue l'une des fonctions importantes de la communication des risques.

Assurer la transparence
Si l'on veut que le public accepte le processus d'analyse du risque et ses conséquences, il faut que ce processus soit transparent. En matière d'analyse du risque, la transparence consiste, dans le respect des préoccupations légitimes de préservation de la confidentialité (par exemple des informations privées/protégées d'un fabricant), à maintenir un processus ouvert et offert à l'examen des parties intéressées. Il est essentiel, si l'on veut parvenir à la transparence, que la gestion des risques préserve une communication interactive efficace entre les gestionnaires du risque, le public et les parties intéressées.

national qui: désigne les autorités compétentes; énumère les exigences règlementaires relatives aux différents stades de développement du produit (recherche-développement, essais au champ ou en milieu confiné, évaluations de sécurité sanitaire avant la mise sur le marché); explique comment les évaluations de sécurité sanitaire sont réalisées et indique clairement comment les décisions sont prises, y compris les opportunités qu'a le public de participer aux décisions et les facteurs pris en compte par les décideurs. Des informations en retour sont également communiquées rapidement de façon à pouvoir donner des renseignements ou des éclaircissements supplémentaires aux parties intéressées.

Par ailleurs, beaucoup d'organismes de réglementation publient des synthèses des décisions concernant certains produits, qui fournissent des détails sur certains évènements transgéniques.

Le rapport d'une Consultation mixte FAO/OMS d'experts sur l'application de la communication sur les risques aux normes alimentaires et à la sécurité sanitaire des aliments fournit une synthèse utile des principes de la communication sur les risques. Ces principes sont destinés à être appliqués par tous ceux qui interviennent dans la communication sur la réglementation et l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés des plantes à ADN recombiné[36].

La communication des risques dans l'évaluation de la sécurité sanitaire

La plupart des pays s'efforcent de fournir des informations claires et complètes sur les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné, mais ces informations s'avèrent souvent trop complexes et multidisciplinaires pour être bien comprises par le public, sans risque de méprise ou d'ambiguïté. La grosse difficulté est de présenter l'information sous une forme adaptée aux différents publics sans que cela nuise à son exactitude. Il faut communiquer le plus de renseignements possible à travers le message pour permettre au consommateur de choisir en connaissance de cause d'accepter ou non l'aliment dérivé d'une plante transgénique, compte tenu du risque que cela implique. Le Comité consultatif canadien de la biotechnologie (CCCB, 2002) a envisagé les options ci-après:

a. **Amélioration de l'information sur le système de réglementation.** Une première étape pourrait consister à améliorer la description et la communication des informations sur le système canadien de réglementation des AGM et des autres aliments nouveaux, et à s'assurer que le matériel fourni est complet, compréhensible et facilement accessible. Divers moyens d'information (Internet, brochures, articles, etc.) pourraient être utilisés pour élargir la diffusion des données. Le matériel pourrait être présenté sous des formes plus ou moins élaborées adaptées à diverses catégories de lecteurs.
b. **Création d'un organe d'information centralisé.** Un organe centralisé d'information des consommateurs sur les biotechnologies alimentaires pourrait donner des renseignements sur la production alimentaire, les AGM et les autres nouveaux aliments issus de la biotechnologie, les lois et règlements pertinents, l'état des connaissances scientifiques, les perspectives concernant les questions éthiques et sociales, les travaux et recherches en cours, et l'appui qui peut être apporté aux activités du gouvernement dans ce domaine. Outre ce qui concerne les aliments traditionnels et les pratiques de sélection végétale, il serait opportun de fournir une description concrète des avantages, des risques et des incertitudes associés aux différents types d'aliments.
c. **Promotion de la sensibilisation et de l'engagement du public.** Outre les options ci-dessus, un programme de communication proactif pourrait être utile pour mieux sensibiliser le public. Des sessions de dialogue avec le public pourraient offrir aux Canadiens des opportunités de faire part de leurs observations sur les AGM.

Le Biotechnology Consortium of India Limited (BCIL), un partenariat public-privé unique en son genre, est un autre portail de communication qui fournit toutes les informations d'ordre

36 FAO. 1999. *L'application de la communication des risques aux normes alimentaires et à la sécurité sanitaire des aliments*. Etude FAO Alimentation et Nutrition 70. Rome, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. http://www.fao.org/docrep/009/x1271f/x1271f00.htm

technique et social concernant l'évaluation de la biosécurité des activités commerciales et de recherche sur les techniques de recombinaison de l'ADN. Inspiré du concept de centre d'échange pour la prévention des risques biotechnologiques, le BCIL anime aussi des ateliers sur des thèmes spécifiques dans différentes régions du pays dans un forum ouvert à l'ensemble des parties prenantes et des organismes de réglementation (BCIL, 2007). Sur le site, des liens ou un accès par téléchargement à des études complètes peuvent être fournis, afin que les parties prenantes disposent des informations nécessaires pour bien comprendre les questions de sécurité sanitaire et les stratégies de gestion efficaces.

Références

APUA. 2000. *Case study in regulatory issues connected with genetically engineered foods: genetically engineered corn runs into regulatory problems in Europe*. A joint project of the University of Illinois, Urbana and the Alliance for the Prudent Use of Antibiotics (Tufts University) to develop a network to monitor resistance in commensal bacteria. 22 pp. http://www.agbios.com/docroot/articles/salyersreport.pdf

Beever, D.E. & Kemp, C.F. 2000. Safety issues associated with the DNA in animal feed derived from genetically modified crops. A review of scientific and regulatory procedures. *Nutr. Abstr. Rev. Series B: Livestock Feeds and Feeding*, 70: 175–182.

Biotechnology Consortium of India Limited (BCIL). 2007. http://bcil.nic.in

Comité Consultatif Canadien de la Biotechnologie (CCCB). 2002. *Améliorer la réglementation des AGM et des autres aliments nouveaux au Canada*. Ottawa, Canada http://www.ic.gc.ca/eic/site/cbac-cccb.nsf/fra/ah00186.html

Commission du Codex Alimentarius. 2003. *Politiques de la commission du Codex Alimentarius en matière d'analyse des risques*. Rome. 30 Juin-3 Juillet 2003. ftp://ftp.fao.org/codex/alinorm03/al03_41f.pdf

Defra. 2001. *Guidance on principles of best practice in the design of genetically modified plants*. Advisory Committee on Releases to the Environment, ACRE, March 2001. http://www.defra.gov.uk/environment/acre/bestprac/consult/guidance/bp/index.htm

Commission européenne. 2003. Guidance document for the risk assessment of genetically modified plants and derived food. Comité scientifique directeur, Commission européenne. 6–7 mars 2003, Bruxelles. APUA. 2000. Case study in regulatory issues connected with genetically engineered foods: genetically engineered corn runs into regulatory problems in Europe. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out327_en.pdf

FAO/OMS. 2000. *Aspects de la salubrité des aliments génétiquement modifiés d'origine végétale. Rapport d'une consultation conjointe d'experts FAO/OMS sur les aliments produits par biotechnologie*, 29. Organisation des Nations-Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), Rome et Organisation mondiale de la santé (OMS). ftp://ftp.fao.org/docrep/nonfao/ae584f/ae584f00.pdf

FAO/OMS. 2001. *Consultation mixte FAO/OMS d'experts sur les aliments dérivés des biotechnologies. Evaluation de l'allergénicité des aliments génétiquement modifiés.* Rome, OMS/FAO, Janvier 2001. ftp://ftp.fao.org/docrep/nonfao/y0820f/y0820f00.pdf

FAO/OMS. 2002. *Groupe spécial intergouvernemental du Codex sur les aliments dérivés des biotechnologies, troisième session*. Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires, Yokohama, Japon, 4–8 Mars 2002. ftp://ftp.fao.org/codex/alinorm03/Al03_34f.pdf

Kuiper, H.A., Kleter, G.A., Noteborn, H.P.J.M. & Kok, E.J. 2001. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. Plant J., 27: 503–528. http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-313X.2001.01119.x

Nelkin, D. 1987. *Selling science: how the press covers science and technology*. New York, W.H. Freeman and Company.

Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). Site Internet Biotech Product Database, http://webdomino1.oecd.org/ehs/bioprod.nsf

Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE). Site Internet Biosécurité- Biotrack, http://www.oecd.org/department/0,3355,fr_2649_34385_1_1_1_1_1,00.html

Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). Site Internet Task Force for the Safety of Novel Foods and Feeds. http://www.oecd.org/document/63/0,2340,en_2649_34391_1905919_1_1_1_1,00.html

Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). 2000. *Consensus documents for the work on the safety of novel foods and feeds*. Organisation de coopération et de développement économiques. http://www.oecd.org/document/9/0,3343,en_2649_34391_1812041_1_1_1_1,00.html

Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). 2000. *Rapport du Groupe d'étude sur la sécurité des nouveaux aliments destinés à la consommation humaine et animale*. Paris, Organisation de coopération et de développement économiques. 72 pp.

Powell, D. & Leiss, W. 1997. *Mad Cows And Mother's Milk: The Perils of Poor Risk Communication*. Kingston, Canada, McGill-Queen's University Press.

Powell, D.A. 2000. Food safety and the consumer perils of poor risk communication. *Can. J. Anim. Sci.*, 80: 393–404 ●

11. Glossaire des termes, des liens et des ressources

Les termes ci-après apparaissent souvent dans la documentation présentée pour les évaluations de sécurité sanitaire. Pour plus d'informations sur la terminologie relative aux biotechnologies, voir le Glossaire FAO de la biotechnologie pour l'alimentation et l'agriculture http://www.fao.org/biotech/index_glossary.asp

Glossaire

Adjuvant
Agent mélangé à un antigène, qui renforce la réponse immunitaire à cet antigène ou l'immunisation.

ADN recombiné
Résultat de la combinaison de fragments d'ADN provenant de sources différentes.

ADN-T
Segment d'ADN du plasmide Ti, présent chez l'agent pathogène *Agrobacterium tumefaciens*, transféré aux cellules végétales et inséré dans leur ADN dans le cadre du processus d'infection. Le type sauvage de l'ADN-T code pour les enzymes qui induisent chez les plantes la synthèse des opines spécifiques nécessaires pour la croissance bactérienne. Dans les ADN-T modifiés, ces gènes sont remplacés par un/des transgène(s).

Aliments génétiquement modifiés (AGM)
Aliments produits à partir d'organismes génétiquement modifiés (OGM) dont le génome a été modifié à l'aide de technologies de génie génétique (ex: maïs génétiquement modifié) ou aliments contenant des ingrédients issus d'OGM (ex: chocolat contenant du soja génétiquement modifié).

Allofécondation
Croisement entre des populations différentes ou des individus d'une même espèce qui ne sont pas des parents proches. Le terme "allofécondation" peut être utilisé pour désigner une pollinisation non intentionnelle de la même culture par une source externe durant la production de semences hybrides.

Approche comparative
L'approche comparative, antérieurement désignée sous le nom d'équivalence substantielle, repose sur le concept que les AGM peuvent être évalués dans une large mesure par comparaison avec des aliments de référence, de consommation courante, déjà considérés comme sûrs (l'équivalent traditionnel ou non modifié de référence). La comparaison porte généralement sur la composition de l'aliment.

Biodisponibilité

Proportion d'un nutriment ou d'un médicament administré, etc. qui peut être assimilée par un organisme sous une forme biologiquement efficace. Par exemple, certains sols riches en phosphore (P) ont une faible disponibilité de P parce que le pH du sol rend une grande partie de cet élément insoluble.

Biosécurité

Prévention des risques pour la santé et la sûreté humaine et pour la conservation de l'environnement, découlant de l'utilisation, pour la recherche et le commerce, d'organismes infectieux ou génétiquement modifiés.

Biotechnologies (modernes)

Application de:

1. techniques *in vitro* aux acides nucléiques, y compris la recombinaison de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'introduction directe d'acides nucléiques dans des cellules ou organites; ou
2. la fusion cellulaire d'organismes n'appartenant pas à une même famille taxonomique, qui surmontent les barrières naturelles de la physiologie de la reproduction ou de la recombinaison et qui ne sont pas des techniques utilisées pour la reproduction et la sélection de type classique (Protocole de Cartagena sur la prévention des risques biotechnologiques).

Biotechnologies (traditionnelles)

1. Toutes les applications technologiques qui utilisent des systèmes biologiques, des organismes vivants ou leurs parties dérivées pour faire ou modifier, des produits ou des procédés pour des usages spécifiques (Convention sur la diversité biologique).
2. Interprétées *stricto sensu*, comprenant les nouvelles techniques de l'ADN, la biologie moléculaire et les applications génétiques, les biotechnologies couvrent diverses technologies telles que la manipulation et le transfert de gènes, le typage de l'ADN et le clonage de végétaux et d'animaux. (Déclaration de la FAO sur les biotechnologies).

Cadre ouvert de lecture (ORF)

Séquence de nucléotides dans une molécule d'ADN pouvant potentiellement coder un peptide ou une protéine: elle comprend le triplet d'initiation (ATG), suivi d'une série de triplets (chacun d'eux code un acide aminé), et se termine par un codon stop (TAA, TAG ou TGA). Ce terme est généralement appliqué aux séquences de fragments d'ADN, pour lesquelles aucune fonction n'est encore déterminée. Le nombre d'ORF fournit une estimation du nombre de gènes transcrits à partir de la séquence d'ADN.

Concatémère

Longue molécule d'ADN constituée d'un même monomère répété et formant un multimère linéaire.

Effet de position

Influence de la position d'un gène (surtout un transgène) sur son expression et ensuite sur son effet phénotypique.

Enchaînement (ou concaténation)

Combinaison d'au moins deux brins d'ADN, dans un ordre défini.

Équivalence substantielle

Concept décrit pour la première fois dans une publication de l'OCDE en 1993, qui souligne que

l'évaluation d'un aliment nouveau, à fortiori s'il s'agit d'un aliment génétiquement modifié, devrait démontrer que l'aliment est "aussi sûr" que son équivalent traditionnel de référence.

Exposition (par le régime) alimentaire
Contact par ingestion entre un agent physique, chimique ou biologique et un organisme.

Gène antisens
Gène qui produit un transcrit (ARNm) complémentaire au pré-ARNm ou à l'ARNm d'un gène normal (généralement construit en intervertissant la région codante par rapport au promoteur).

Génie génétique
Modification des génotypes, et donc des phénotypes, par transgénèse, celle-ci étant l'introduction d'un ou plusieurs gènes dans des cellules végétales ou animales menant à la transmission du gène introduit (transgène) aux générations successives.

Haptène
Petite molécule qui n'est pas elle-même un antigène, mais qui, au sein d'une structure plus grande et en se liant à une protéine porteuse, peut servir comme déterminant antigénique.

Immunoglobuline E (IgE)
Les immunoglobulines de classe E (IgE) sont des anticorps hautement spécialisés qui sont produits dans le tissu lymphatique près des voies respiratoires et du tube digestif. Bien qu'elles ne représentent que 0,001 pour cent des anticorps, les immunoglubines IgE sont impliquées dans pratiquement toutes les réactions allergiques. Les anticorps IgE se lient à leur allergène respectif et stimulent la production de substances qui provoquent une inflammation. La réaction immunitaire exagérée qui s'ensuit est appelée allergie. Les anticorps spécialisés IgE peuvent être détectés dans le sérum sanguin des individus sensibles aux allergènes correspondants.

Invasivité
Capacité d'une plante à coloniser un habitat perturbé et à concurrencer les espèces cultivées.

Lignée parentale isogène
Dans les plantes génétiquement modifiées, les lignées initiales isogènes sont les plantes non modifiées dont sont issues les souches génétiquement modifiées. Ainsi, la seule différence entre des plantes transgéniques et leur lignée isogène dérivée est représentée par les gènes qui ont été transférés par des techniques de génie génétique. L'évaluation des plantes génétiquement modifiées en vue de détecter d'éventuels effets inattendus se fait par comparaison avec des souches parentales non modifiées. Pour éliminer toute influence possible d'une variation génétique normale entre différentes variétés et lignées héréditaires, les lignées isogènes servent généralement de référence pour les comparaisons.

Mise sous silence d'un gène
Terme général décrivant des processus épigénétiques de régulation de gènes, se référant à un événement d'interruption ou de suppression de l'expression d'un gène. La régulation des gènes se fait au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel. La mise sous silence transcriptionnelle d'un gène résulte de modifications de l'histone, créant une région d'hétérochromatine autour d'un gène qui le rend inaccessible au mécanisme de la transcription. La mise sous silence post-transcriptionnelle d'un gène résulte de la destruction de l'ARNm d'un gène particulier, qui empêche la traduction du gène en un produit de gène actif. L'expression «mise sous silence d'un gène» que l'on trouve fréquemment dans la littérature, se réfère à une réaction naturelle des plantes à des niveaux d'expression élevés d'un gène étranger. Toutefois, l'expression d'un gène

étranger ne conduit pas nécessairement à la mise sous silence du gène, qui est favorisée par de nombreux facteurs, notamment la nature et l'orientation des transgènes étrangers, les niveaux d'expression et la phase de développement.

Modification post-traductionnelle

Addition de résidus chimiques spécifiques à une protéine après la traduction. Les résidus les plus communs sont les groupements phosphates (phosphorylation) et les sucres (glycosylation).

Nombre de copies

Nombre de copies d'un plasmide particulier dans une cellule bactérienne, ou d'un gène dans un génome.

Organisme génétiquement modifié

Organisme qui a été transformé par l'insertion d'un ou de plusieurs transgènes.

Plasmide assistant

Plasmide conférant une ou plusieurs fonctions à un autre plasmide dans la même cellule.

Pléiotropie (effets pléiotropes)

Effet simultané d'un gène donné sur plus d'un caractère qui, apparemment, ne lui est pas lié.

Produit traditionnel de référence

Variété de plante apparentée, ses composants et/ou ses produits, pour lesquels existe une expérience de l'innocuité basée sur une utilisation courante en tant qu'aliment.

Recombiné

Terme utilisé en génétique classique et moléculaire.

1. En génétique classique: un organisme ou une cellule résultant d'une recombinaison méiotique.
2. En génétique moléculaire: une molécule hybride composée d'ADN obtenu à partir de différents organismes.

Test de digestibilité *in vitro*

Il existe des méthodes permettant de déterminer la digestibilité des composites contenant des protéines, notamment des aliments et des ingrédients alimentaires pour animaux. L'incubation du composite avec des protéases, suivie de la détermination des liaisons peptidiques hydrolysées en sont des exemples. Ces méthodes sont appropriées pour déterminer rapidement, dans le cadre d'opérations de routine, la digestibilité des aliments destinés à la consommation humaine et animale, dans les installations de transformation.

Toxicocinétique

Étude du devenir des substances toxiques dans un organisme vivant au cours du temps. Cette étude couvre les processus d'absorption, de distribution, de stockage, de métabolisation et d'élimination.

Transgène

Séquence d'un gène isolée, utilisée pour transformer un organisme. Souvent, mais pas toujours, le transgène provient d'une espèce différente de celle du receveur.

Liens et ressources

Organisations intergouvernementales

Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

Le site Web multilingue de la FAO sur les biotechnologies permet d'accéder à des nouvelles et évènements d'actualité, des documents, un forum électronique, un glossaire, des documents sur les politiques des pays en matière de biotechnologie et d'autres informations utiles sur de nombreux aspects des biotechnologies modernes. http://www.fao.org/biotech

Codex Alimentarius

La Commission du Codex alimentarius a été créée en 1963 par la FAO et l'OMS pour élaborer des normes alimentaires, des directives et d'autres textes connexes, tels que des codes d'usages, dans le cadre du Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires. Dans le domaine de la sécurité sanitaire des AGM, le Groupe spécial intergouvernemental du Codex sur les aliments dérivés des biotechnologies a publié les *Principes pour l'analyse des risques liés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes et la Directive régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné*, qui constituent les Annexes 1 et 2 de la présente monographie. http://www.codexalimentarius.net/web/index_fr.jsp

Organisation mondiale de la santé

Les travaux de l'OMS ont porté sur un large éventail de questions dans le domaine des biotechnologies et de la santé humaine, notamment l'évaluation de l'innocuité des vaccins produits à l'aide de biotechnologies, le clonage humain et les thérapies géniques. http://www.who.int/foodsafety/biotech/en/

Organisation de coopération et de développement économiques

Le Programme de travail de l'OCDE concernant la sécurité des nouveaux aliments destinés à la consommation humaine et animale a pour objet de promouvoir une harmonisation internationale de l'évaluation de la sécurité sanitaire et de la règlementation des AGM destinés à la consommation humaine et animale, y compris des produits issus de la biotechnologie moderne. Le Groupe d'étude de l'OCDE a décidé, à sa première session, en 1999, de centrer ses travaux sur l'élaboration de « documents de consensus » à caractère scientifique, susceptibles de recueillir l'adhésion de tous ses membres. Ces documents contiennent des informations utiles pour l'évaluation règlementaire de produits spécifiques destinés à l'alimentation humaine ou animale. Dans le contexte de la sécurité sanitaire de ces aliments, les documents de consensus portent sur les nutriments, les facteurs antinutritionnels ou les substances toxiques, sur l'utilisation du produit comme aliment destiné à la consommation humaine ou animale, ou sur d'autres aspects pertinents. http://www.OCDE.org/topic/0,2686,en_2649_37437_1_1_1_1_37437,00.html

Centre d'échange pour la prévention des risques biotechnologiques

Le Centre d'échange pour la prévention des risques biotechnologiques est un mécanisme d'échange d'informations établi par le Protocole de Cartagena sur la prévention des risques biotechnologiques, pour aider les Parties à appliquer ses dispositions et faciliter l'échange d'informations et de données d'expérience sur les organismes vivants modifiés (OVM). http://bch.biodiv.org/

Centre international pour le génie génétique et la biotechnologie

Le CIGGB offre un large éventail d'informations. La page Web BioSafety offre un grand nombre de liens vers des traités, conventions et réunions de portée internationale, y compris les soumissions des États Membres. http://www.icgeb.org

Organisation des Nations Unies pour le développement industriel

L'ONUDI est la seule organisation qui tient des bases de données détaillées de portée internationale sur les principales statistiques industrielles. L'Organisation a établi un réseau de centres régionaux qui dispensent une formation très complète sur la biosécurité.
http://binas.unido.org/wiki/index.php/Main_Page

Institut pour la santé et la protection des consommateurs (IHCP) du Centre commun de recherche (JRC)

L'IHCP relève de la Direction générale du Centre commun de recherche, dont il remplit la mission (fournir un soutien scientifique aux politiques en matière de santé et de protection des consommateurs). http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/

Quelques sites Internet sur les instances gouvernementales de règlementation des aliments génétiquement modifiés

Australie et Nouvelle-Zélande

Food Safety Australia New Zealand (FSANZ).
http://www.foodstandards.gov.au/foodmatters/gmfoods/index.cfm

Canada

Santé Canada.
http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/index-fra.php

Commission européenne

Autorité européenne de sécurité des aliments
http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo.html

Inde

Département des biotechnologies: règlementations en matière de biosécurité.
http://dbtbiosafety.nic.in/

Japon

Ministère de la Santé, du Travail et de la Protection sociale.
http://www.mhlw.go.jp/english/topics/food/index.html

États-Unis

Food and Drug Administration, http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/biotechm.html#reg
United States Department of Agriculture, http://www.usda.gov
United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, http://www.epa.gov/ ●

Annexes

Documents pertinents du Codex

Apéndices 1.
Principes pour l'analyse des risques liés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes CAC/GL 44-2003

Section 1 – Introduction

1. Pour de nombreux aliments, le niveau de sécurité sanitaire généralement accepté par la société reflète l'historique de leur consommation sûre par l'homme. Il est reconnu que dans la plupart des cas, les connaissances requises pour gérer les risques associés aux aliments ont été acquises au cours de leur longue histoire d'usage. Les aliments sont généralement considérés sains pour autant qu'ils aient fait l'objet de soins particuliers durant le développement, la production primaire, la transformation, l'entreposage, la manutention et la préparation.

2. Les dangers associés aux aliments sont soumis au processus de l'analyse des risques de la Commission du Codex Alimentarius pour évaluer des risques potentiels et, si nécessaire, pour développer des approches en vue de gérer ces risques. La conduite de l'analyse des risques est guidée par les décisions générales de la Commission du Codex Alimentarius[1] ainsi que par les Principes de travail pour l'analyse des risques[2] du Codex.

3. Alors que l'analyse des risques est utilisée depuis longtemps pour les risques chimiques (ex: résidus de pesticides, contaminants, additifs alimentaires, et auxiliaires technologiques) et qu'elle l'est de plus en plus pour les dangers microbiologiques et les facteurs nutritionnels, les principes n'ont pas été élaborés spécifiquement pour les aliments entiers.

4. L'approche de l'analyse des risques peut, en termes généraux, être appliquée aux aliments, y compris ceux qui sont dérivés des biotechnologies modernes. Il est toutefois reconnu que cette approche doit être modifiée quand elle est appliquée à un aliment entier plutôt qu'à un danger bien précis qui pourrait être présent dans l'aliment.

5. Les principes présentés dans le présent document doivent être lus en conjonction avec les Principes de travail du Codex pour l'analyse des risques, dont ces principes sont complémentaires.

6. Le cas échéant, les résultats d'une évaluation de risques appliqués par d'autres autorités réglementaires peuvent être utilisés pour aider à l'analyse des risques et éviter une répétition du travail.

Section 2 – Champ d'application et définitions

7. L'objectif de ces principes est de fournir un cadre pour l'application de l'analyse des risques en matière de sécurité sanitaire et de nutrition des aliments dérivés des biotechnologies modernes. Ce document n'aborde pas l'environnement, les aspects éthiques, moraux et socio-économiques de la recherche, le développement, la production et la commercialisation de ces aliments[3].

8. Les définitions ci-dessous s'appliquent à ces principes:

- «**Biotechnologie moderne**» s'entend par l'application:
  - i) de techniques de manipulation in vitro des acides nucléiques, y compris la recombinaison de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'introduction directe d'acides nucléiques dans des cellules ou organites, ou
  - ii) de la fusion cellulaire d'organismes n'appartenant pas à une même famille taxonomique, qui surmontent les barrières naturelles de la physiologie de la reproduction ou de la recombinaison et qui ne sont pas des techniques utilisées pour la reproduction et la sélection de type classique[4].
- «**Produit traditionnel de référence**» signifie un organisme/variété apparenté, ses composants et/ou produits, pour lesquels il existe une expérience bien établie de la sécurité sanitaire basée sur son utilisation courante en tant qu'aliment.[5]

Section 3 – Principes

9. Le processus de l'analyse des risques pour les aliments dérivés des biotechnologies modernes devrait être

1 Ces décisions incluent les *Déclarations de principes concernant le rôle de la science dans la prise de décision du Codex et les autres facteurs à prendre en considération, et les Déclarations de principes sur le rôle de l'évaluation des risques en matière de sécurité sanitaire des aliments* (Commission du Codex Alimentarius, Manuel de procédure; treizième édition).

2 «Principes de travail pour l'analyse des risques destinés à être appliqués dans le cadre du Codex Alimentarius» (adoptés lors de la vingt-sixième session de la Commission du Codex Alimentarius, 2003; Manuel de Procédure de la Commission du Codex Alimentarius, treizième édition).

3 Ce document ne concerne pas l'alimentation animale ni les animaux nourris avec ces aliments sauf dans la mesure où ces animaux ont été développés au moyen de biotechnologies modernes.

4 Cette définition est tirée du Protocole de Cartagena sur la prévention des risques biotechnologiques relatif à la Convention sur la Diversité Biologique.

5 I est admis que dans un avenir proche, les aliments dérivés des biotechnologies modernes ne seront pas utilisés comme produits traditionnels de référence.

compatible avec les Principes de travail pour l'analyse des risques du Codex.

Évaluation des risques

10 L'évaluation des risques comporte une évaluation de la sécurité sanitaire, qui vise à déterminer si un danger, d'ordre nutritionnel ou tout autre problème de sécurité sanitaire est présent, et dans l'affirmative, à collecter des informations sur sa nature et sa gravité. L'évaluation de la sécurité sanitaire devrait inclure une comparaison entre l'aliment dérivé des biotechnologies modernes et le produit traditionnel de référence, en mettant l'accent sur la détermination des similitudes et des différences. Si un danger nouveau ou modifié, nutritionnel ou un autre problème de sécurité sanitaire était identifié par l'évaluation des risques, les risques qui y sont associés devraient être caractérisés pour déterminer sa pertinence pour la santé humaine.

11 Une évaluation de la sécurité sanitaire est caractérisée par une évaluation d'un aliment entier ou de l'un de ses composants, par rapport au produit traditionnel de référence en:

A) prenant en compte à la fois les effets souhaités et les effets inattendus;
B) identifiant des dangers nouveaux ou modifiés;
C) identifiant des modifications pertinentes pour la santé humaine concernant les éléments nutritifs essentiels.

12 Une évaluation de la sécurité sanitaire avant la mise sur le marché devrait être entreprise, en suivant une approche structurée et intégrée, et effectuée sur la base du cas par cas. Les données et informations, basées sur une science solide, obtenues en utilisant des méthodes appropriées et analysées suivant des techniques statistiques appropriées, devraient être d'une qualité et, le cas échéant, d'une quantité qui puissent résister à une revue scientifique critique.

13 L'évaluation des risques devrait s'appliquer à tous les aspects pertinents des aliments dérivés des biotechnologies modernes. L'approche de l'évaluation des risques pour ces aliments est basée sur l'examen des informations et données multidisciplinaires reposant sur des éléments scientifiques, en tenant compte des facteurs mentionnés dans les lignes directrices jointes[6].

14 Les données scientifiques pour l'évaluation des risques sont généralement obtenues auprès de sources diverses, telles que l'obtenteur du produit, la littérature scientifique, des informations techniques générales, des scientifiques indépendants, des organismes réglementaires, des organes internationaux et autres parties intéressées. Les données devraient être évaluées en utilisant des méthodes scientifiques appropriées d'analyse des risques.

15 L'évaluation des risques doit tenir compte de toutes les données scientifiques disponibles et informations provenant de différentes procédures analytiques, à condition que ces procédures soient scientifiquement solides et que les paramètres mesurés soient comparables.

Gestion des risques

16 Les mesures de gestion des risques pour les aliments dérivés des biotechnologies modernes devraient êtres proportionnelles aux risques, basées sur les résultats de l'évaluation des risques et tenir compte, le cas échéant, d'autres facteurs légitimes conformément aux dispositions générales de la Commission du Codex Alimentarius[7] ainsi qu'aux Principes de travail pour l'analyse des risques du Codex.

17 Il devrait être reconnu que différentes mesures de gestion des risques peuvent être capables d'assurer le même degré de protection du consommateur en ce qui concerne la gestion des risques associés à la sécurité sanitaire et aux impacts nutritionnels sur la santé humaine, et seraient par conséquent équivalentes.

18 Les gestionnaires des risques devraient prendre en compte les incertitudes identifiées dans l'évaluation des risques et mettre en place des mesures appropriées pour gérer ces incertitudes.

19 Les mesures de gestion des risques peuvent inclure, le cas échéant, l'étiquetage des aliments[8], les conditions pour l'approbation de commercialisation et la surveillance après la mise sur le marché.

20 La surveillance après la mise sur le marché peut être une mesure appropriée de gestion des risques dans des circonstances spécifiques. Sa nécessité et son utilité devraient être examinées au cas par cas, durant l'évaluation des risques et la possibilité d'application pratique devrait être examinée durant la gestion des risques. La surveillance après la mise sur le marché devrait être entreprise dans le but de:

A) vérifier les conclusions au sujet de l'absence ou de l'éventuelle survenue, de l'impact et de l'importance d'effets potentiels sur la santé du consommateur; et
B) surveiller les changements dans les niveaux d'ingestion des nutriments, associés à l'introduction d'aliments sus-

6 Référence est faite à la Directive régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné (CAC/GL 45-2003), à la Directive régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments produits à l'aide de micro-organismes à ADN recombiné (CAC/GL 46-2003) et à la Directive régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés d'animaux à ADN recombiné (CAC/GL 68-2008).

7 Voir la note de bas de page 1.

8 Référence est faite à l'avant-projet de Directives du CCFL pour l'étiquetage des aliments et des ingrédients alimentaires obtenus à l'aide de certaines techniques de modifications génétiques/génie génétique à l'étape 3 des procédures.

ceptibles de modifier significativement le statut nutritionnel, afin d'établir leur impact sur la santé humaine.

21. Des outils spécifiques peuvent être nécessaires pour faciliter la mise en œuvre et l'application des mesures des gestion des risques. Ces outils peuvent comprendre des méthodes analytiques appropriées, des matériels de référence, et la traçabilité des produits[9] dans le but de faciliter le retrait du marché quand un risque pour la santé humaine a été identifié ou la surveillance après la mise sur le marché dans les circonstances indiquées au paragraphe 20.

Communication sur risques

22. Une communication efficace sur les risques est essentielle durant toutes les phases de l'évaluation et de la gestion des risques. C'est un processus interactif qui implique toutes les parties concernées, y compris le gouvernement, l'industrie, les milieux universitaires, les médias et les consommateurs.

23. La communication sur les risques devrait inclure des processus décisionnels transparents d'évaluation de la sécurité sanitaire et de gestion des risques. Ces processus devraient être totalement documentés à toutes les étapes et ouverts à la vérification publique, tout en respectant les préoccupations légitimes quant à la confidentialité des informations commerciales et industrielles. En particulier, les rapports préparés sur les évaluations de la sécurité sanitaire et les autres aspects du processus de décisions devraient être disponibles pour toutes les parties intéressées.

24. Une communication efficace sur les risques devrait inclure des processus de consultation réceptifs. Ces processus de consultation devraient être interactifs. Les points de vue de toutes les parties intéressées devraient être recherchés et les questions pertinentes de sécurité sanitaire des aliments et de nutrition soulevées durant cette consultation devraient être prises en compte pendant le processus d'analyse des risques.

Cohérence

25. Une approche cohérente devrait être adoptée pour caractériser et gérer les risques portant sur la sécurité sanitaire des aliments et la nutrition associés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes. Des différences injustifiées de niveau des risques présentés par ces aliments et les produits traditionnels de référence devraient être évitées.

26. Un cadre réglementaire transparent et bien défini devrait être mis en place pour la caractérisation et la gestion des risques associés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes. Il devrait assurer la cohérence en ce qui concerne les données requises, les cadres pour l'évaluation, le niveau acceptable de risque, les mécanismes de communication et de consultation ainsi que des processus décisionnels rapides.

Renforcement des capacités et échange d'informations

27. Des efforts devraient être faits pour améliorer les capacités des autorités réglementaires, en particulier dans les pays en développement, pour évaluer, gérer et assurer la communication sur les risques associés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes, y compris d'en imposer l'application, ou interpréter les résultats des évaluations réalisées par d'autres autorités ou organismes d'expertise reconnus, y compris l'accès aux technologies analytiques. En outre, le renforcement des capacités pour les pays en développment, que ce soit par des accords bilatéraux ou avec l'aide d'organisations internationales, devrait avoir pour but l'application de ces principes.[10]

28. Les autorités réglementaires, organisations internationales et organismes d'expertise et l'industrie devraient faciliter l'échange d'informations, y compris sur les méthodes analytiques, par le biais de points de contact appropriés comprenant mais sans s'y limiter les points de contact du Codex et d'autres moyens adéquats.

Processus de révision

29. La méthodologie d'analyse des risques et sa mise en œuvre devraient être compatible avec les nouvelles connaissances scientifiques et autres informations pertinentes pour l'analyse des risques.

30. Etant donné l'évolution rapide du secteur des biotechnologies, l'approche en matière d'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés des biotechnologies modernes devrait être autant que de besoin réexaminée, afin de s'assurer que les dernières informations scientifiques disponibles sont intégrées dans l'analyse des risques. Lorsque de nouvelles informations scientifiques concernant une évaluation de risques deviennent disponibles, l'évaluation devrait être revue pour intégrer cette information et, le cas échéant, les mesures de gestion des risques adaptées en conséquence ●

9 Il est admis que le traçage de produit a d'autres applications. Celles-ci doivent se conformer aux dispositions des accords SPS et OTC. L'application de la traçabilité du produit dans les domaines couverts par les deux accords a été examinée par le Comité du Codex sur les systèmes d'inspection et de certification des importations et exportations alimentaires, voir CAC/GL 60-2006: *Principes applicables à la traçabilité/au traçage des produits en tant qu'outil d'un système d'inspection et de certification des denrées alimentaires.*

10 Référence est faite à l'assistance technique des dispositions de l'Article 9 de l'accord SPS et de l'Article 11 de l'accord OTC.

Apéndices 2. Directive régissant la conduite de l'évaluation de la sécuritésanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné CAC/GL 45-2003

Section 1 – Champ d'application

1. Cette directive est un complément des Principes pour l'analyse des risques des aliments dérivés des biotechnologies modernes. Elle traite de la sécurité sanitaire et des aspects nutritionnels des aliments composés ou dérivés de plantes possédant un historique d'une utilisation sans risque et qui ont été modifiées à l'aide de biotechnologies modernes pour exprimer des caractéristiques nouvelles ou changées.

2. Ce document ne s'applique ni aux aliments pour animaux ni aux animaux nourris avec ces aliments. Il ne traite pas non plus des risques pour l'environnement.

3. Les principes d'analyse des risques du Codex, particulièrement ceux pour l'évaluation des risques, sont tout d'abord destinés à être appliqués à des entités chimiques discrets comme les additifs alimentaires et les résidus de pesticides ou à un contaminant chimique ou microbien spécifique qui présentent des dangers ou des risques identifiables; ils ne sont pas destinés à s'appliquer aux aliments entiers comme tels. En effet, peu d'aliments ont été évalués scientifiquement d'une manière qui permette de caractériser tous les risques liés à ceux-ci. De plus, beaucoup d'aliments contiennent des substances qui seraient probablement classées comme dangereuses si elles avaient été soumises aux approches classiques d'analyse de sécurité sanitaire. Une approche plus focalisée est donc requise lorsque l'on considère la sécurité sanitaire d'un aliment entier.

4. Cette approche repose sur le principe que la sécurité sanitaire d'aliments dérivés de nouvelles variétés de plantes, notamment les plantes à ADN recombiné, est évaluée par rapport au produit traditionnel de référence ayant un historique d'une utilisation sans risque, en tenant compte à la fois des effets souhaités et des effets involontaires. Plutôt que de chercher à identifier tous les dangers associés à un aliment donné, le but est de déceler des dangers nouveaux ou changés par rapport au produit traditionnel de référence.

5. Cette approche d'évaluation de la sécurité sanitaire s'inscrit dans le cadre d'évaluation des risques tel qu'il est décrit à la Section 3 des *Principes d'analyse des risques liés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes*. Si un danger nutritionnel ou autre problème de sécurité alimentaire, nouveau ou changé, est identifié par l'évaluation de la sécurité, le risque associé à celui-ci devrait d'abord être examiné pour mesurer son effet sur la santé humaine. Après l'évaluation de la sécurité sanitaire et, au besoin, l'évaluation d'autres risques, l'aliment devrait être soumis aux considérations de gestion des risques en accord avec les Principes d'analyse des risques liés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes avant que sa distribution commerciale ne soit envisagée.

6. Les mesures de gestion de risques telles que la surveillance après la mise sur le marché des effets sur la santé du consommateur peut aider le processus d'évaluation des risques. Elles sont décrites au paragraphe 20 des Principes pour l'analyse des risques liés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes.

7. Cette directive décrit l'approche recommandée pour effectuer les évaluations de sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné pour lesquelles existe un produit traditionnel de référence, et identifie les informations et données généralement applicables pour réaliser de telles évaluations. Bien que cette directive soit destinée aux aliments dérivés de plantes à ADN recombiné, l'approche décrite pourrait plus généralement être appliquée aux aliments dérivés de végétaux qui ont été modifiés par d'autres techniques.

Section 2 – Définitions

8. Les définitions ci-dessous s'appliquent à la présente Directive.

- «**Plante à ADN recombiné**» – signifie une plante dans laquelle le matériel génétique a été modifié au moyen de techniques de manipulation in vitro des acides nucléiques, y compris la recombinaison de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'introduction directe d'acides nucléiques dans les cellules ou les organites.
- «**Produit traditionnel de référence**» – signifie une variété de plante apparentée, ses composants et/ou ses produits, pour lesquels existe une expérience de l'innocuité basée sur une utilisation courante en tant qu'aliment.[1]

Section 3 – Introduction à l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments

9. Traditionnellement, les nouvelles variétés de plantes alimentaires n'ont pas systématiquement été soumises

[1] Il est reconnu que dans un avenir prévisible, les aliments dérivés des biotechnologies modernes ne seront pas utilisés comme produit traditionnel de référence.

à des évaluations chimiques, toxicologiques, ou nutritionnelles approfondies avant leur commercialisation, à l'exception des aliments destinés à des groupes spécifiques, comme les nourrissons, pour lesquels l'aliment peut constituer une part importante du régime alimentaire. Ainsi, les caractéristiques agronomiques et phénotypiques de nouvelles variétés de maïs, soja, pomme de terre et autres plantes alimentaires courantes sont évaluées par les sélectionneurs, mais les aliments dérivés de ces nouvelles variétés ne sont généralement pas soumis à des procédures d'analyse de sécurité sanitaire rigoureuses et approfondies, telles que les études sur animaux, qui sont usuelles pour les produits chimiques comme les additifs alimentaires ou les résidus de pesticides qui pourraient être présents dans les aliments.

10. L'utilisation de modèles animaux pour évaluer les limites toxicologiques est un élément majeur de l'évaluation des risques associés à de nombreux composés tels que les pesticides. Toutefois, dans la plupart des cas, la substance à évaluer est bien définie, de pureté connue, sans valeur nutritive particulière, et l'exposition humaine au composé est généralement faible. Il est par conséquent relativement simple de donner de tels composés à des animaux à des doses d'ordres de grandeur plus élevés que les niveaux d'exposition attendus chez l'homme, afin de déceler les éventuels effets néfastes pour la santé humaine. De cette façon, il est possible, dans la plupart des cas, d'estimer les niveaux d'exposition pour lesquels on n'observe pas d'effets néfastes, et de fixer des niveaux d'ingestion sûrs en appliquant des facteurs de sécurité appropriés.

11. Les études sur animaux ne peuvent être directement appliquées à l'examen des risques associés avec des aliments entiers, qui sont des mélanges complexes de composés souvent caractérisés par une grande variation de composition et de valeur nutritionnelle. Du fait de leur volume et de leur effet sur la satiété, ils ne peuvent généralement être donnés aux animaux qu'à des doses qui ne sont que de faibles proportions des quantités qui constituent le régime alimentaire chez l'homme. En outre, la valeur nutritionnelle et l'équilibre des régimes alimentaires utilisés est un élément important que doivent prendre en considération les études sur les animaux pour éviter l'induction d'effets néfastes sans rapport direct avec l'aliment en question. Détecter des effets néfastes éventuels et les associer définitivement à une caractéristique particulière de l'aliment peut donc être extrêmement difficile. Si la caractérisation de l'aliments indique que les données disponibles sont insuffisantes pour une évaluation fine de la sécurité sanitaire, des études sur les animaux correctement conçues pourraient être demandées pour les aliments entiers. Quant à savoir s'il est nécessaire d'effectuer des études sur les animaux, il faut pour cela déterminer s'il convient ou non de soumettre des animaux d'expérience à de telles études lorsqu'il est peu probable que celles-ci aboutissent à des données pertinentes.

12. Compte tenu des difficultés que représente l'application des procédures traditionnelles d'essai toxicologiques et d'évaluation des risques aux aliments entiers, l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés des végétaux alimentaires, plantes à ADN recombiné incluses requiert une approche plus spécifique. D'où le développement d'une approche multidisciplinaire d'évaluation de la sécurité qui prend en compte à la fois les changements souhaités et les changements involontaires qui peuvent se produire dans la plante ou dans les aliments dérivés de celle-ci, en utilisant le concept d'*équivalence substantielle*.

13. Le concept d'équivalence substantielle est une étape clé dans le processus d'évaluation de la sécurité sanitaire. Ce n'est pas en soi une évaluation de sécurité sanitaire, mais représente plutôt le point de départ utilisé pour structurer l'évaluation de la sécurité sanitaire d'un nouvel aliment par rapport au produit traditionnel de référence[2]. Ce concept est utilisé pour identifier les similarités et les différences entre le nouvel aliment et son produit traditionnel de référence. Il aide à l'identification de problèmes éventuels de sécurité ou de nutrition et est considéré comme la stratégie la plus appropriée à ce jour pour évaluer la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné. Effectuée de cette façon, l'évaluation des risques ne peut garantir la sécurité absolue du nouveau produit. Elle vise plutôt à évaluer la sécurité associée à tout écart observé afin de pouvoir comparer la sécurité offerte par le nouveau produit à celle du produit traditionnel de référence.

Effets involontaires

14. Lors de la réalisation de l'objectif consistant à conférer un caractère spécifique (effet souhaité) à une plante par l'insertion des séquences d'ADN définies, des caractères additionnels peuvent, dans certains cas, être acquis ou des caractères existants peuvent être perdus ou modifiés (effets involontaires). L'apparition éventuelle d'effets involontaires n'est pas limitée à l'usage des techniques de manipulation *in vitro* des acides nucléiques. C'est un phénomène inhérent et général qui peut aussi se produire au cours des sélections classiques. Les effets involontaires peuvent être nocifs, bénéfiques ou neutres en ce qui concerne la santé de la plante ou la sécurité sanitaire des aliments

[2] Le concept d'équivalence en substance (équivalence substantielle) comme décrit dans le rapport de consultation mixte FAO/OMS d'experts (2000) (Document WHO/SDE/PHE/FOS/00.6, OMS, Genève, 2000).

dérivés de celle-ci. Des effets involontaires se produisant dans les plantes à ADN recombiné pourraient aussi être dus à l'insertion de séquences d'ADN et/ou à des sélections classiques ultérieures des plantes à ADN recombiné. L'évaluation de la sécurité doit inclure des données et des informations pour réduire la possibilité qu'un aliment dérivé d'une plante à ADN recombiné ait un effet néfaste, involontaire sur la santé humaine.

15. Des effets involontaires peuvent résulter de l'insertion aléatoire de séquences d'ADN dans le génome de la plante, cette insertion pouvant interrompre ou réprimer des gènes existants et activer des gènes silencieux, ou induire des modifications d'expression des gènes existants. Des effets involontaires peuvent également résulter de la formation de nouveaux ou modifiés profils de métabolites. Par exemple, de hauts niveaux d'expression d'enzymes peuvent induire des effets biochimiques secondaires ou des changements dans la régulation des voies métaboliques et/ou de niveaux modifiés de métabolites.

16. Les effets involontaires dus à la modification génétique peuvent être subdivisés en deux groupes: ceux qui sont «prévisibles» et ceux qui sont «imprévus». Beaucoup d'effets involontaires sont, dans la plupart des cas, prévisibles sur la base des connaissances que l'on a du gène introduit et de ses implications métaboliques ou du site d'insertion. Du fait de l'accroissement des informations sur le génome végétal et de l'accroissement de la spécificité en termes de matériel génétique introduit par les techniques de recombinaison d'ADN comparativement aux méthodes classiques de sélection végétale, il pourra être plus facile de prédire les effets involontaires d'une modification particulière. Des techniques de biologie et de biochimie moléculaires peuvent aussi être utilisées pour analyser les changements éventuels au niveau de la transcription des gènes et de la traduction des messagers, qui pourraient conduire à des effets involontaires.

17. L'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de végétaux à ADN recombiné fait appel à des méthodes précises pour identifier et détecter de tels effets involontaires et des procédures pour évaluer leur explication biologique et leur impact éventuel sur la sécurité sanitaire des aliments. Diverses données et informations sont nécessaires pour évaluer des effets involontaires puisqu'un simple test n'est pas suffisant pour détecter tous les effets involontaires possibles ou identifier, avec certitude, ceux qui sont pertinents en matière d'impact sur la santé humaine. Ces données et informations, prises dans leur globalité, fournissent une garantie que l'aliment présente une faible probabilité d'avoir des effets néfastes sur la santé humaine. L'évaluation des effets involontaires prend en compte les caractéristiques agronomiques/phénotypiques de la plante qui sont communément observées par les sélectionneurs lors de la sélection de nouvelles variétés à commercialiser. Ces observations des sélectionneurs fournissent un premier crible des plantes qui révèlent des caractères indésirables. Les nouvelles variétés qui passent cette sélection sont soumises à une évaluation de la sécurité sanitaire comme décrit aux sections 4 et 5.

Cadre de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments

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.

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.

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.

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.

Section 4 – Considérations générales

Description de la plante à ADN recombiné

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.

Description de la plante hôte et de son utilisation comme aliment

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.

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.

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 micro- éléments nutritifs importants elle fournit au régime alimentaire).

Description de l'organisme ou des organismes donneur(s)

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)

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.

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;

29. Les 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.

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

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.

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.

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.

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.

Évaluation de la sécurité sanitaire

Substances exprimées (substances qui ne sont pas des acides-nucléiques)

Évaluation de la toxicité éventuelle

34. Les techniques de manipulation *in vitro* des acides nucléiques permettent l'introduction d'ADN, qui peut résulter en la synthèse de nouvelles substances dans les plantes. Ces nouvelles substances peuvent être des composés classiques des plantes alimentaires, comme les protéines, les graisses, les hydrates de carbone, les vitamines, qui sont nouveaux dans le contexte de cette plante à ADN recombiné. Les nouvelles substances peuvent également comprendre de nouveaux métabolites résultant de l'activité des enzymes générées par l'expression de l'ADN introduit.

35. L'évaluation de la sécurité sanitaire devrait tenir compte de la nature chimique et la fonction de la nouvelle substance exprimée et mesurer la concentration de la substance dans les parties comestibles de la plante à ADN recombiné, en incluant, le cas échéant, les valeurs moyennes et ses écart-types. L'exposition par le régime alimentaire actuel et les effets éventuels sur des groupes particuliers de la population devraient aussi être considérés.

36. Les informations devraient être fournies pour s'assurer que les gènes d'organisme(s) donneur(s) codant pour des toxines connues ou des facteurs antinutritionnels présents dans le ou les organisme(s) donneur(s) ne sont pas transférés à des plantes à ADN recombiné qui n'expriment pas normalement ces toxines ou caractéristiques antinutritionnels. Cette garantie est particulièrement importante dans les cas où une plante à ADN recombiné est préparée différemment du végétal donneur, étant donné que les techniques de transformation alimentaire habituellement associées à l'organisme donneur peuvent désactiver; dégrader ou éliminer les facteurs antinutritionnels ou les composés toxiques.

37. Pour les raisons décrites à la Section 3, des études toxicologiques classiques peuvent ne pas être considérées nécessaires lorsque la substance ou une substance apparentée très proche a, en tenant compte de sa fonction et de son exposition, déjà été consommée dans l'alimentation sans incidents. Dans les autres cas, l'utilisation d'études toxicologiques classiques appropriées ou d'autres études de la nouvelle substance peut-être nécessaire.

38. Dans le cas de protéines, l'évaluation de la toxicité potentielle devrait se focaliser sur les similarités des séquences d'acides aminés entre la protéine d'une part et les protéines toxiques et les facteurs antinutritionnels (ex: inhibiteurs de protéases, lectines) connus d'autre part, ainsi que sur leur stabilité, à la chaleur, ou au processus de transformation et à la dégradation dans des modèles de simulation représentatifs des conditions gastriques et intestinales. Des études de toxicité orales[3] appropriées peuvent être nécessaires à mener dans le cas où la protéine présente dans l'aliment n'est pas similaire à des protéines précédemment consommées sans incidents dans les aliments, et en tenant compte de sa fonction biologique quand elle est connue.

39. La toxicité potentielle de substances non protéiques introduites qui n'ont pas été consommées sans incidents dans les aliments devrait être évaluée sur la base du au cas par cas selon l'identité et la fonction biologique de la substance dans la plante et selon l'exposition alimentaire. Le type d'études à réaliser peut inclure des études portant sur le métabolisme, la toxicocinétique, la toxicité subchronique, la toxicité chronique, la carcinogénicité, la toxicité sur la fonction de reproduction et le développement, conformément aux approches toxicologiques traditionnelles.

40. Cela peut nécessiter l'isolement de la nouvelle substance à partir de la plante à ADN recombiné, ou la synthèse ou la production de cette substance à partir d'une source alternative, auquel cas il devrait être montré que le matériel étudié est équivalent sur le plan biochimique, structurel et fonctionnel à celui produit dans la plante à ADN recombiné.

Evaluation de l'allergénicité potentielle (protéines)

41. Quand la ou les protéine(s) résultant du gène inséré est présente dans les aliments, son allergénécité potentielle devrait être évaluée dans tous les cas. Une approche au cas par cas, progressive et intégrée utilisée dans l'évaluation de l'allergénicité potentielle de(s) nouvelle(s) protéines exprimée(s) devrait reposer sur divers critères utilisés en combinaison (puisqu'aucun critère n'est à lui seul suffisamment prédictif pour l'allergénicité ou la non-allergénicité). Comme indiqué au paragraphe 20, les données devraient être obtenues avec des méthodes scientifiques solides. Une présentation détaillée des points à considérer se trouve dans l'Annexe 1 au présent document[4].

42. Les nouvelles protéines exprimées dans les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné devraient être évaluées pour tout rôle éventuel dans l'activation d'entéropathies de sensibilité au gluten si le matériel génétique exprimé est obtenu à partir de blé, seigle, orge, avoine, ou de graines de céréales apparentées.

43. Le transfert de gènes issus d'aliments communément allergéniques et à partir d'aliments connus pour induire l'entéropathie de sensibilité au gluten chez les sujets sensibles devrait être évité à moins que ne soit documenté le fait que le gène en question ne code pas pour un allergène ou pour une protéine impliquée dans l'entéropathie de sensibilité au gluten.

Analyses de la composition en composants clés

44. Des analyses de concentrations des composants clés[5] des plantes à ADN recombiné et, spécialement ceux

3 Des lignes directrices pour les études de toxicité orale ont été élaborées dans les forums internationaux, par exemple, les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

4 Le rapport 2001 de la Consultation d'experts FAO/OMS qui comprend une référence à plusieurs arbres de décision a été utilisé pour élaborer l'Annexe 1 à cette directive.

5 Les nutriments essentiels ou anti-nutriments essentiels sont les constituants d'un aliment donné pouvant avoir un impact substantiel sur le régime alimentaire. Ils peuvent être des constituants majeurs (nutriments: graisses, protéines,

caractéristiques de l'aliment, devraient être comparées par une analyse équivalente d'un produit traditionnel de référence cultivé et récolté dans les mêmes conditions. Dans certains cas, il peut être nécessaire de considérer la nécessité d'une comparaison complémentaire avec la plante à ADN recombiné cultivée dans les conditions agronomiques prévues (ex: application d'un herbicide). La signification statistique de toute différence observée devrait être évaluée dans le contexte de la gamme de la variation naturelle du paramètre analysé pour déterminer sa signification biologique. Le référentiel utilisé dans cette évaluation devrait être idéalement une lignée parentale la plus proche de l'isogénie. Cela peut ne pas être possible dans les cas, et dans ce cas la lignée la plus proche possible devrait être choisie. Le but de cette comparaison, conjointement à une nécessaire -évaluation de l'exposition, est d'établir que les substances importantes pour la nutrition ou qui peuvent affecter la sécurité sanitaire de l'aliment n'ont pas été altérées de telle façon qu'elles auraient un impact néfaste sur la santé humaine.

45. La localisation des sites d'essais devrait être représentative de la gamme de conditions environnementales dans laquelle cette variété de plante est censée être cultivée. Le nombre de sites d'essai devrait être suffisant pour permettre une évaluation précise des caractéristiques de composition dans l'ensemble de ces conditions. De même, les essais devraient être conduits sur un nombre de génération suffisant pour permettre une exposition conforme à la variété des conditions rencontrées dans la nature. Afin de minimiser les effets environnementaux, et pour réduire les effets de variations génotypiques survenant naturellement au sein d'une variété cultivée, chaque site d'essais devrait être répliqué. Un nombre adéquate de plantes devraient être échantillonnées et les méthodes d'analyse devraient être suffisamment sensibles et spécifiques pour détecter des variations des composants clés.

Evaluation des métabolites

46. Certaines plantes à ADN recombiné peuvent avoir été modifiées de telle sorte qu'il pourrait en résulter des nouveaux métabolites ou des modifications des niveaux de divers métabolites dans l'aliment. Une attention particulière devrait être portée à l'accumulation potentielle, dans les aliments, de métabolites qui pourraient avoir un effet néfaste sur la santé humaine. L'évaluation de la sécurité sanitaire de telles plantes nécessite l'investigation des niveaux de résidus et de métabolites dans l'aliment et l'évaluation de tout changement dans les profils des nutriments. Lorsque des modifications de niveaux de résidus ou de métabolites sont identifiés dans les aliments, une attention particulière doit être donnée aux impacts éventuels sur la santé humaine en utilisant les procédures classiques d'établissement de la sécurité sanitaire de tels métabolites (ex: procédures pour évaluer l'innocuité des produits chimiques dans les aliments pour la santé humaine).

Transformation des aliments

47. Les éventuels effets de la transformation des aliments, y compris une préparation à domicile, effectuée sur des aliments dérivé de plantes à ADN recombiné devraient être considérés. Par exemple, des changements peuvent survenir en ce qui concerne la stabilité à la chaleur d'un toxique endogène ou la biodisponibilité d'un élément nutritionnel important après transformation. De ce fait, des informations décrivant les conditions de transformation appliquées dans la production d'un aliment à partir de la plante devraient être fournies. Par exemple, dans le cas d'huiles végétales, des informations devraient être fournies sur le processus d'extraction et les étapes de raffinage consécutives.

Modification nutritionnelle

48. L'évaluation d'une éventuelle modification de composition des nutriments clés, qui devrait être conduite pour toutes les plantes à ADN recombiné, a déjà été abordée dans les *Analyses de la composition en composants clés*. Toutefois, les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné qui ont subi des modifications afin de modifier intentionnellement leur qualité nutritionnelle ou leur fonctionnalité devraient être soumis à des évaluations nutritionnelles supplémentaires pour évaluer les conséquences de ces changements, et montrer si l'apport en nutriments est susceptible d'être modifié par l'introduction de ce type d'aliments dans les rations alimentaires. Une présentation détaillée des questions examinées figure à l'Annexe 2 du présent document

49. Des informations sur les profils d'utilisation et de consommation connus d'un aliment et de ses dérivés devraient être utilisées pour estimer la consommation probable des aliments dérivés de la plante à ADN recombiné considérée. Le niveau attendu de consommation de l'aliment devrait être utilisé pour évaluer les implications nutritionnelles du profil modifié des nutriments aux niveaux habituel et maximal de consommation. En basant ces estimations sur la probabilité de consommation la plus haute, on apporte la garantie que le potentiel de tout effet nutri-

hydrates de carbone; anti-nutriments: inhibiteurs d'enzymes) ou des constituants mineurs (minéraux, vitamines). Les principales substances toxiques sont les composés toxicologiquement significatifs connus et présents naturellement dans la plante, comme les composés dont la toxicité potentielle et les concentrations peuvent influer significativement sur la santé (ex: la solanine des pommes de terre si sa concentration augmente, le sélénium dans le blé) et les allergènes.

tionnel indésirable sera détecté. Une attention particulière devrait être portée aux caractéristiques physiologiques particulières et exigences métaboliques de groupes de population spécifiques, tels que les nourrissons, les enfants, les femmes enceintes ou allaitantes, les personnes âgées et celles souffrant de maladies chroniques ou de systèmes immunitaires déficients. Sur la base de l'analyse des impacts nutritionnels et des besoins alimentaires de sous-groupes spécifiques de la population, des évaluations nutritionnelles additionnelles peuvent s'avérer nécessaires. Il est aussi important de vérifier dans quelle mesure l'élément nutritif modifié est biodisponible et reste stable au cours du temps, de la transformation et du stockage.

50. La pratique de sélection de plantes, incluant les techniques de manipulation *in vitro* des acides nucléiques, pour modifier les niveaux de nutriments dans les plantes cultivées peut induire des changements importants dans le profil des nutriments de deux manières. La modification intentionnelle des composés de la plante peut changer l'intégralité du profil nutritionnel du produit de la plante et ce changement peut affecter le statut nutritionnel des individus qui consomment cet aliment. Des modifications imprévues dans les nutriments peuvent avoir les mêmes effets. Bien que les composés de la plante à ADN recombiné aient été individuellement évalués comme sûrs, l'impact du changement sur le profil général des nutriments devrait être déterminé.

51. Quand les modifications résultent en un produit alimentaire, comme de l'huile végétale, de composition significativement différente du produit traditionnel de référence il peut être approprié d'utiliser d'autres aliments ou composants alimentaires traditionnels (des aliments ou composants alimentaires dont la composition nutritionnelle est la plus proche de celle de l'aliment dérivé d'une plante à ADN recombiné) comme référentiels appropriés pour évaluer l'impact nutritionnel de l'aliment.

52. Du fait des variations géographiques et culturelles des profils de consommation alimentaire, des changements nutritionnels associés à un aliment spécifique peuvent avoir un impact plus important dans certaines régions géographiques ou cultures que dans d'autres. Quelques plantes servent de source majeure pour un nutriment particulier chez certaines populations. Les nutriments et les populations concernées devraient être identifiés.

53. Certains aliments peuvent nécessiter des tests complémentaires. Par exemple, des études d'alimentarité sur animaux peuvent être justifiées pour les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné, si des changements sur la biodisponibilité des nutriments sont attendus ou si leur composition n'est pas comparable à celle d'aliments traditionnels. Les aliments conçus pour améliorer la santé peuvent nécessiter des études nutritionnelles spécifiques, toxicologiques, ou tout autre étude qui soit appropriée. Si la caractérisation de l'aliment indique que les données disponibles sont insuffisantes pour une évaluation complète de son innocuité, des études sur animaux correctement conçues peuvent être demandées sur les aliments entiers.

Section 5 – autres considérations

Accumulation potentielle de substances significatives pour la santé humaine

54. Certaines plantes à ADN recombiné peuvent présenter des traits (par exemple, une tolérance à un herbicide) qui peuvent conduire indirectement à une accumulation potentielle de résidus de pesticides, de métabolites dégradés de ces résidus, de métabolites toxiques, de contaminants ou d'autres substances qui peuvent être néfastes pour la santé humaine. L'évaluation de la sécurité devrait prendre en compte ce potentiel d'accumulation. Les procédures traditionnelles pour établir la sécurité sanitaire de ces composés (c'est-à-dire pour l'évaluation de la sécurité des produits chimiques pour l'homme) devraient être appliquées.

Utilisation de gènes marqueurs de résistance aux antibiotiques

55. Les technologies de modification génétique alternatives qui ne conduisent pas à la présence de gènes marqueurs de résistance à un antibiotique devraient être utilisées pour des développements futurs de plantes à ADN recombiné, lorsque ces technologies sont disponibles et qu'elles ont démontré qu'elles sont sûres.

56. Le transfert de gènes à partir des plantes et de leurs produits alimentaires à des micro-organismes de la flore intestinale ou à des cellules humaines est considéré comme une rare possibilité, du fait qu'il implique l'enchaînement de nombreux événements complexes et improbables. Néanmoins, la possibilité de tels événements ne peut pas être complètement écartée.[6]

57. Lors de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments contenant des gènes marqueurs de résistance à un antibiotique, les facteurs suivants devraient être pris en considération:

A) l'utilisation clinique et vétérinaire et l'importance de l'antibiotique en question;
(Certains antibiotiques sont actuellement les seuls médicaments efficaces disponibles pour traiter certaines patho-

6 Dans les cas où les bactéries résistantes à l'antibiotique existent à des hauts niveaux dans la nature, la probabilité que de telles bactéries transfèrent cette résistance à d'autres bactéries est d'ordres de grandeur plus élevés que celle de transferts des aliments ingérés aux bactéries.

logies (ex: la vancomycine pour le traitement de certaines infections par staphylocoques). Les gènes marqueurs conférant la résistance à de tels antibiotiques ne devraient pas être utilisés dans les plantes à ADN recombiné).

B) si la présence dans l'aliment d'une enzyme ou d'une protéine codée par le gène marqueur de résistance peut affecter l'efficacité thérapeutique d'un antibiotique administré par voie orale, et
(Cette évaluation devrait fournir une estimation de la quantité d'antibiotique ingéré par voie orale qui pourrait être dégradée du fait de la présence de l'enzyme dans l'aliment, en prenant en compte des facteurs tels que le dosage de l'antibiotique, la quantité d'enzyme susceptible de rester dans l'aliment après exposition aux conditions digestives, y compris dans des conditions neutres ou alcalines de l'estomac, et la nécessité de cofacteurs (ex: ATP) pour l'activité enzymatique ainsi que la concentration estimée de tels facteurs dans l'aliment.)

C) l'innocuité du produit du gène, comme c'est le cas pour tout autre produit de gène exprimé.

58. Si l'analyse des données et des informations suggère que la présence du gène marqueur de résistance à un antibiotique ou un produit du gène présente des risques pour la santé humaine, le gène marqueur ou son produit ne devrait pas être présent dans l'aliment. Les gènes de résistance à un antibiotique utilisés dans la production alimentaire qui confèrent des résistances à des antibiotiques utilisés à des fins thérapeutiques ne devraient pas être présents dans les aliments.

Révision des évaluations de sécurité sanitaire

59. L'objectif des évaluations de sécurité sanitaire est de pouvoir conclure si le nouvel aliment est ou non aussi sain que le produit traditionnel de référence en prenant en compte l'impact sur le régime alimentaire de tous les changements dans le contenu ou la valeur nutritionnels. Néanmoins, l'évaluation de la sécurité devrait être réexaminée à la lumière de toute nouvelle information scientifique qui remettrait en cause les conclusions de l'évaluation initiale de la sécurité.

Annexe 1. Évaluation de l'allergénicité potentielle

Section 1 – Introduction

1. Toute nouvelle protéine exprimée[7] chez les plantes à ADN recombiné qui pourrait être présente dans l'aliment final devrait être évaluée sur le plan de son potentiel à générer des réactions allergiques. Ceci devrait conduire à examiner si une protéine nouvellement exprimée correspond à l'une de celles auxquelles certaines personnes sont déjà sensibles, et si une protéine nouvelle, dans l'apport alimentaire est susceptible d'induire des réactions allergiques chez certaines personnes.

2. Il n'existe pas pour le moment de méthodes définitives qui permettent de prédire la relation d'une réaction allergique chez l'homme avec une protéine nouvellement exprimée. En conséquence, pour évaluer l'allergénicité potentielle des protéines nouvellement exprimées, il est recommandé d'utiliser une approche au cas par cas, progressive et intégrée. Cette approche prend en compte les preuves provenant de différents types d'information et de données, car aucun critère n'est à lui seul suffisamment prédictif.

3. Le résultat de l'évaluation est une conclusion quant à la probabilité que la protéine soit un allergène alimentaire.

Section 2 – Stratégie d'évaluation

4. Les étapes initiales de l'évaluation de l'allergénicité potentielle de toute protéine nouvellement exprimée consistent à déterminer: l'origine de la protéine introduite, toute similarité significative entre la séquence d'acides aminés de la protéine et celle des allergènes connus, ses propriétés structurelles, y compris, sans s'y limiter, sa sensibilité à la dégradation enzymatique, et sa stabilité à la chaleur et /ou aux traitements enzymatique et acide.

5. Comme aucun test unique ne peut prédire la probabilité d'une réponse IgE humaine suite à une exposition par voie orale, la première étape pour caractériser des protéines nouvellement exprimées devrait être la comparaison de la séquence d'acides aminés et de certaines caractéristiques physicochimiques de la nouvelle protéine exprimée avec celles d'allergènes connus en suivant une méthode reposant sur le poids de la preuve. Cela nécessitera la purification de toutes nouvelles protéines exprimées chez la plante à ADN recombiné, ou la synthèse ou la production de la substance à partir d'une autre source, auquel cas le matériel devrait être démontré équivalent sur le plan structurel, fonctionnel et biochimique à celui produit dans la plante à ADN recombiné. Une attention particulière devrait être portée sur le choix de l'hôte d'expression, puisque des modifications post-traductionnelles permises par des hôtes

[7] Cette stratégie d'évaluation ne s'applique pas pour évaluer si les nouvelles protéines exprimées sont capables d'induire une sensibilité au gluten ou d'autres entéropathies. La question des entéropathies est traitée dans l'Evaluation de l'allergénicité otentielle (protéines), paragraphe 42 de la directive régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné. De plus, la stratégie ne s'applique pas à l'évaluation des aliments quand l'expression des produits géniques est réduite à des fins hypoallergéniques.

différents (c'est-à-dire les systèmes eucaryotiques versus les systèmes procaryotiques) peuvent avoir un impact sur le potentiel allergénique de la protéine.

6. Il est important d'établir si la source est connue pour provoquer des réactions allergiques. Les gènes dérivés de sources allergéniques connues devraient être présumés codants pour un allergène, à moins que des preuves scientifiques démontrent le contraire.

Section 3 – Évaluation initiale

Section 3.1 – Source de la protéine

7. En tant qu'élément de données étayant la sécurité sanitaire des aliments dérivés des plantes à ADN recombiné, l'information devrait décrire tout cas d'allergénicité associé à l'organisme donneur. Les sources allergisantes de gènes seraient définies comme les organismes pour lesquels il existe une preuve raisonnable qu'ils causent des réactions allergiques médiées par les IgE suite à des expositions par la voie orale, respiratoire ou cutanée. La connaissance de la source de la protéine introduite permet l'identification des outils et des données pertinents à considérer pour l'évaluation de l'allergénicité. Ceux-ci comprennent: la disponibilité de sérums à des fins de criblage; le type, la gravité et la fréquence des réactions allergiques documentées; et les caractéristiques structurelles et la séquence des acides aminés; les propriétés immunologiques et physicochimiques (lorsque disponibles) des protéines allergéniques connues provenant de cette source.

Section 3.2 – Homologie de la séquence d'acides aminés

8. L'objectif de la comparaison des homologies de séquence est d'évaluer à quel point la structure d'une protéine nouvellement exprimée est similaire à celle d'un allergène connu. Cette information peut indiquer si cette protéine a un potentiel allergénique. Les recherches de l'homologie de séquence en comparant la structure de toute protéine nouvellement exprimée avec tous les allergènes connus devraient être effectuées. Les recherches devraient être menées en utilisant différents algorithmes, tels que FASTA ou BLASTP, afin de prédire toute similarité structurelle générale. Des stratégies, telles que des recherches par étapes de segments d'acides aminés contigus identiques peuvent être effectuées pour déterminer les séquences qui peuvent constituer des épitopes linéaires. La taille des segments d'acides aminés contigus recherchés devrait être fondée sur une base scientifique justifiée en vue de minimiser la possibilité d'obtention de faux négatifs ou de faux positifs[8]. Des procédures d'évaluation et de recherche validées devraient être utilisées afin d'obtenir des résultats biologiquement pertinents.

9. La réactivité croisée des IgE entre une protéine nouvellement exprimée et un allergène connu devrait être considérée comme possible quand il y a plus de 35 % d'identité pour un segment de 80 acides aminés ou plus (FAO/OMS 2001) ou selon un autre critère scientifiquement justifié. Toutes les informations résultant de la comparaison de l'homologie de séquence entre la protéine nouvellement exprimée et les allergènes connus devraient être rapportées pour permettre une évaluation scientifiquement fondée au cas par cas.

10. Les recherches d'homologie de séquence ont certaines limites. En particulier, les comparaisons se limitent aux séquences d'allergènes connus se trouvant dans les banques de données accessibles au public et la littérature scientifique. Il y a également des limites dans la capacité de ces comparaisons à détecter des épitopes non contigus capables de se fixer eux-mêmes spécifiquement aux anticorps IgE.

11. Un résultat négatif d'homologie de séquence indique que la protéine nouvellement exprimée n'est pas un allergène connu et qu'elle n'est pas susceptible d'avoir une réactivité croisée avec des allergènes connus. Un résultat indiquant l'absence d'une homologie de séquence significative devrait être pris en compte avec l'ensemble des autres données découlant de cette stratégie lorsqu'on évalue le potentiel allergénique de protéines nouvellement exprimées. Des études approfondies devraient être menées lorsque cela s'avère nécessaire (voir aussi les sections 4 et 5). Un résultat positif d'homologie de séquence indique que la protéine nouvellement exprimée est susceptible d'être allergénique. Si le produit devait être considéré plus avant, il devrait être évalué au moyen de sérum provenant des personnes sensibles à la source allergénique identifiée.

Section 3.3 – Résistance à la pepsine

12. La résistance à la digestion par la pepsine a été observée pour différents allergènes alimentaires; il existe donc une corrélation entre la résistance à la digestion par la pepsine et le potentiel allergénique.[9] Par conséquent, la résistance d'une protéine à la dégradation en présence de pepsine sous les conditions appropriées indique qu'il faut mener une analyse plus poussée pour déterminer si la pro-

8 On reconnaît que la consultation FAO/OMS 2001 a suggéré de faire passer de 8 à 6 acides aminés, les recherches de segments identiques. Plus la séquence de peptides utilisée dans la comparaison progressive est petite, plus il est vraisemblable d'obtenir des faux positifs et, inversement, plus la séquence de peptides utilisée est grande, plus il est vraisemblable d'obtenir des faux négatifs, ce qui réduit l'utilité de la comparaison.

9 La méthode décrite dans United States Pharmacopoeia (1995) a servi à établir cette corrélation (Astwood *et coll.* 1996).

téine nouvellement exprimée est allergénique. L'établissement d'un protocole de dégradation de la pepsine cohérent et bien-validé pourrait améliorer l'utilité de cette méthode. Cependant, il devrait être pris en compte le fait que l'absence de résistance à la pepsine n'exclut pas que la protéine nouvellement exprimée puisse être un allergène avéré.

13. Bien que le protocole de résistance à la pepsine soit fortement recommandé, il est reconnu que d'autres protocoles de sensibilité aux enzymes existent. Ces autres protocoles peuvent être utilisés lorsque les justifications adéquates sont apportées.[10]

Section 4 – Dépistage de sérums spécifiques

14. Pour ces protéines provenant d'une source allergénique connue, ou qui ont une homologie de séquence avec un allergène connu, des tests immunologiques devraient être effectués lorsque les sérums existent. Les sérums de personnes qui ont une allergie cliniquement reconnue à la source de protéine peuvent être utilisés pour tester la fixation spécifique de la protéine aux anticorps de la catégorie IgE dans des essais *in vitro*. La question critique pour de tels essais sera la disponibilité de sérums humains provenant d'un nombre suffisant de personnes.[11] De plus, la qualité des sérums et la procédure d'essai doivent être normalisées pour donner un résultat de test valide. Pour les protéines provenant de sources non connues pour être allergéniques et qui ne présentent pas d'homologie de séquence avec un allergène connu, un criblage ciblé de sérum, peut être considéré lorsque ces tests, tels que décrits au paragraphe 17, sont disponibles.

15. Dans le cas d'une protéine nouvellement exprimée dérivée d'une source allergénique connue, un résultat négatif lors d'essais immunologiques in vitro ne doit pas être considéré comme suffisant, mais devrait inciter à mener des essais supplémentaires, tels que le recours possible à des tests cutanés et à des protocoles[12] *ex vivo*. Un résultat positif à de tels tests indiquerait un potentiel allergène.

Section 5 – Autres considérations

16. L'exposition absolue à la protéine nouvellement exprimée et les effets des procédés de transformation alimentaire pertinents conduiront à une conclusion générale sur le potentiel de risque pour la santé humaine. À cet égard, la nature du produit alimentaire destiné à la consommation devrait être prise en considération lors de la détermination des types de transformation qui seraient utilisés et leurs effets sur la présence de la protéine dans le produit alimentaire final.

17. Comme les connaissances scientifiques et la technologie évoluent, d'autres méthodes et outils peuvent être examinés pour évaluer le potentiel d'allergénicité des protéines nouvellement exprimées dans le cadre de la stratégie d'évaluation. Ces méthodes devraient être scientifiquement solides et comprendre un criblage ciblé de sérum (c'est-à-dire l'évaluation de fixation sur IgE dans le sérum des individus avec des réponses allergiques validées cliniquement pour des catégories d'aliments largement apparentés); la constitution de banques de sérum internationales; l'utilisation de modèles animaux; et l'examen de protéines nouvellement exprimées pour les épitopes des cellules T et les motifs structurels associés aux allergènes.

Annexe 2. Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de à ADN recombiné modifiées à des fins nutritionnelles et de santé

Section 1 – Introduction

1. La Directive régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné (CAC/GL 45-2003) (Directive du Codex sur les plantes) comprend des lignes directrices générales pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné. Cette annexe comprend d'autres considérations qui se rapportent spécifiquement aux aliments modifiés à des fins nutritionnelles et de santé. Le champ d'application de ce document ne dépasse pas l'évaluation de la sécurité sanitaire et, par conséquent, il ne comprend pas l'évaluation des avantages mêmes ou toute allégation relative à la santé ou mesure de gestion des risques correspondante[13].

2. Les facteurs suivants déterminent si une plante à ADN recombiné est une plante à ADN recombiné modifiée

10 Rapport de la Consultation mixte FAO/OMS d'experts sur l'allergénicité des aliments dérivés des biotechnologies (2001): section 6 «résistance à la pepsine».

11 Selon le rapport de la Consultation mixte FAO/OMS d'experts sur l'évaluation de l'allergénicité des aliments dérivés des biotechnologies (22-25 janvier 2001, Rome, Italie), un minimum de 8 sérums pertinents est requis pour atteindre une certitude de 99% que la nouvelle protéine n'est pas un allergène dans le cas d'un allergène majeur. De même, un minimum de 24 sérums pertinents est requis pour atteindre le même niveau de certitude dans le cas d'un allergène mineur. Il est reconnu que ces quantités de sérums peuvent ne pas être disponibles pour des questions de mise à l'essai.

12 La procédure ex vivo est décrite comme étant le test de l'allergénicité à l'aide de cultures de cellules ou de tissus provenant de sujets humains allergiques (Rapport de la Consultation mixte FAO/OMS d'experts sur l'évaluation de l'allergénicité des aliments dérivés des biotechnologies).

13 Principes pour l'analyse des risques liés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes (CAC/GL 44-2003, paragraphe 19).

à des fins nutritionnelles et de santé et, à ce titre, entre dans le champ d'application de la présente annexe:

a) La plante à ADN recombiné présente un trait particulier dans sa portion destinée à l'alimentation.
b) Ce trait est le résultat de: i) l'introduction de nouveau(x) nutriment(s) ou de substance(s) apparentée(s); ii) la modification de la quantité ou de la biodisponibilité de nouveau(x) nutriment(s) ou de substance(s) apparentée(s); iii) l'élimination ou la réduction de substance(s) indésirable(s) (par exemple allergènes ou produits toxiques), ou iv) la modification de l'interaction de ces substances sur le plan nutritionnel ou sanitaire.

Section 2 – Définition

3. La définition suivante se rapporte à la présente annexe: '*élément nutritif*'[14], toute substance normalement consommée en tant que constituant d'un aliment:

a) qui fournit de l'énergie; ou
b) qui est nécessaire à la croissance, au développement et au maintien de la vie en bonne santé; ou
c) en l'absence duquel se produisent des altérations biochimiques ou physiologiques caractéristiques.

4. La présente Annexe utilise, selon qu'il convient, des définitions de concepts nutritionnels fondamentaux figurant ou devant être élaborées dans des textes pertinents du Codex, notamment dans ceux préparés par le Comité du Codex sur la nutrition et les aliments diététiques ou de régime.

Section 3 – Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments

5. Les Principes généraux régissant l'adjonction d'éléments nutritifs aux aliments du Codex (CAG/GL 09-1987) s'appliquent généralement à l'évaluation des aliments dérivés de plantes modifiées par l'augmentation de la quantité d'éléments nutritifs ou de substances apparentées qui sont disponibles pour l'absorption et le métabolisme. Le cadre de la sécurité sanitaire des aliments souligné dans la Directive du Codex sur les plantes[15] s'applique à l'évaluation globale de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné modifiées à des fins nutritionnelles et de santé. Il est possible de trouver d'autres considérations sur l'évaluation de la sécurité sanitaire de ces aliments dans la présente annexe.

6. Bien que les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné modifiées à des fins nutritionnelles et de santé puissent comporter des avantages pour certaines populations/sous-populations, ils peuvent représenter des risques pour d'autres[16].

7. Plutôt que de chercher à identifier tous les dangers associés à un aliment donné, l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné vise à déceler les dangers nouveaux ou changés par rapport au produit traditionnel de référence[17]. Comme les plantes à ADN recombiné modifiées à des fins nutritionnelles et de santé engendrent des produits alimentaires dont la composition peut être très différente de leurs produits traditionnels de référence, le choix d'un facteur de comparaison approprié[18] est d'une grande importance dans le cadre de l'évaluation de la sécurité sanitaire dont il est question dans la présente annexe. Les changements notés pour une plante modifiée à des fins nutritionnelles et de santé font l'objet de cette évaluation de la sécurité sanitaire.

8. Les limites supérieures d'apport de nombreux éléments nutritifs fixées par des organismes nationaux, régionaux et internationaux[19] pourraient être prises en considération, au besoin. La base utilisée pour calculer ces limites doit aussi être prise en considération pour évaluer, au niveau de la santé publique, les implications d'un éventuel dépassement des limites.

9. L'évaluation de la sécurité sanitaire de substances apparentées doit suivre une approche au cas par cas tenant compte des limites supérieures et d'autres valeurs, au besoin.

10. Bien qu'il soit préférable d'utiliser une limite supérieure d'apport déterminée de manière scientifique pour un élément nutritif ou une substance apparentée, lorsqu'aucune valeur n'est déterminée à cet effet, il est possible de prendre en considération les antécédents d'utilisation sûre établis pour les éléments nutritifs ou les substances apparentées consommés dans le régime alimentaire, si l'exposition prévue ou prévisible correspond à ces limites d'antécédents d'utilisation sûre.

11. Lors de l'enrichissement traditionnel des aliments, un élément nutritif ou une substance apparentée est ajouté à des concentrations contrôlées et sa forme chimique est caractérisée. Les niveaux de concentration des éléments nutritifs ou des substances apparentées des plantes peu-

14 Principes généraux régissant l'adjonction d'éléments nutritifs aux aliments - CAC/GL 09-1987.

15 Paragraphes 18-21 (Cadre de la sécurité) et 48-53 (Modification nutritionnelle).

16 Le paragraphe 49 de la Directive du Codex sur les plantes donne des lignes directrices supplémentaires pour les groupes de population fragiles et très à risque.

17 Directive du Codex sur les plantes, paragraphe 4.

18 Directive du Codex sur les plantes, paragraphe 51.

19 Lorsque ces lignes directrices ne sont pas données par Codex, il est préférable de prendre en considération les renseignements fournis par la FAO/l'OMS.

vent varier en raison des conditions de croissance, autant pour les plantes que l'on fait pousser de manière traditionnelle que pour celles dont l'ADN a été recombiné. De plus, plusieurs formes chimiques de l'élément nutritif peuvent être exprimées dans l'aliment en raison de cette modification et celles-ci pourraient ne pas être caractérisées d'un point de vue nutritionnel. Selon le cas, des renseignements pourraient être requis sur les différentes formes chimiques des éléments nutritifs ou des substances apparentées compris dans la portion de la plante destinée à l'alimentation, ainsi que sur leur niveau respectif.

12. La biodisponibilité des éléments nutritifs, des substances apparentées ou des substances indésirables se trouvant dans les aliments dérivés qui étaient l'objet de la modification de plantes à ADN recombiné doit être établie, au besoin. Si plusieurs formes chimiques de l'élément nutritif ou de la substance apparentée sont présentes, il conviendra, le cas échéant, de déterminer leur biodisponibilité combinée.

13. La biodisponibilité varie selon les éléments nutritifs, et les méthodes de détermination de la biodisponibilité doivent être appropriées pour l'élément nutritif, l'aliment contenant l'élément nutritif, ainsi que la santé, l'état nutritionnel et les habitudes alimentaires des populations précises consommant cet aliment. Il existe des méthodes de détermination de la biodisponibilité *in vitro* et *in vivo*, cette dernière étant effectuée sur les animaux et les humains. Les méthodes in vitro peuvent fournir des renseignements sur l'évaluation du degré de libération d'une substance provenant des tissus végétaux pendant la digestion. Les études in vivo sur les animaux ont un intérêt limité pour évaluer la valeur nutritionnelle ou la biodisponibilité d'un élément nutritif pour les êtres humains et exigeraient une conception très attentive pour être pertinentes. Les études in vivo sur les humains peuvent fournir plus de renseignements pertinents, à savoir si l'élément nutritif ou la substance apparentée est biodisponible, et à quel degré.

14. Le paragraphe 49 de la Directive du Codex sur les plantes comprend des lignes directrices sur l'évaluation de l'exposition alimentaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné ayant subi des modifications sur le plan nutritionnel. Dans le contexte de la présente annexe, l'évaluation de l'exposition alimentaire correspond à l'estimation de la concentration des éléments nutritifs ou des substances apparentées dans un aliment, à la consommation prévue ou prévisible de cet aliment et à tout facteur connu ayant une incidence sur la biodisponibilité. L'exposition à des éléments nutritifs ou à des substances apparentées doit être évaluée dans le contexte de l'ensemble du régime, et l'évaluation doit être effectuée selon la consommation alimentaire habituelle de l'aliment correspondant qui risque d'être remplacé, dans la population visée. Lors de l'évaluation de l'exposition, il convient de tenir compte d'informations sur d'éventuels effets nutritionnels négatifs découlant de la consommation de l'aliment modifié, par rapport à l'aliment qu'il est censé remplacer. La plupart des aspects de l'évaluation de l'exposition, sinon tous, ne sont pas exclusifs aux plantes à ADN recombiné modifiées à des fins nutritionnelles et de santé.[20]

15. La première étape d'une évaluation de l'exposition consiste à déterminer les niveaux des substances en question dans la portion de la plante destinée à l'alimentation. La Directive du Codex sur les plantes comprend des lignes directrices sur la détermination des changements de niveaux de ces substances[21].

16. Les habitudes de consommation varient d'un pays à l'autre selon l'importance de l'aliment dans l'alimentation d'une population donnée. Ainsi, il est recommandé de tirer les estimations de la consommation des données sur la consommation alimentaire nationale ou régionale, lorsque cela est possible, et d'utiliser les lignes directrices existantes[22] sur l'estimation de l'exposition au sein d'une population donnée. Lorsque les données nationales et régionales sur la consommation d'aliments ne sont pas disponibles, les données sur les disponibilités alimentaires peuvent s'avérer une ressource utile[23].

17. Afin d'évaluer la sécurité sanitaire d'un aliment dérivé d'une plante à ADN recombiné modifiée à des fins nutritionnelles et de santé, l'apport estimé de l'élément nutritif ou de la substance apparentée au sein de la population est comparé aux valeurs de référence nutritionnelles ou toxicologiques, comme les limites supérieures d'apport, les DJA pour cet élément nutritif ou substance apparentée, lorsque ces valeurs existent. Cette démarche peut comprendre des évaluations de différents scénarios de consommation par rapport à la valeur de référence nutritionnelle, en tenant compte des changements possibles de la biodisponibilité, ou englober des méthodes probabilistes qui caractérisent la distribution des expositions dans les populations visées.

---

20 Des lignes d'orientations complémentaires sur l'évaluation de l'exposition d'origine alimentaire des éléments nutritifs et substances apparentées figurent dans le rapport d'un Atelier technique conjoint FAO/OMS sur l'évaluation des risques liés aux nutriments, siège de l'OMS, Genève, Suisse, 2-6 mai 2005.

21 Paragraphes 44 et 45.

22 Modèle pour l'établissement de limites supérieures d'apport en nutriments et substances apparentées. Rapport d'un atelier technique conjoint FAO/OMS sur l'évaluation des risques liés aux nutriments, siège de l'OMS, Genève, Suisse, 2-6 mai 2005.

23 Les données sur les produits alimentaires de base peuvent être complétées par des informations tirées des bilans alimentaires de la FAO.

Annexe 3.
Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments en cas de présence à faible concentration de matériel végétal à ADN recombiné dans les aliments

Section 1 – Préambule

1. Un nombre croissant de plantes à ADN recombiné est autorisé pour la production commerciale, pourtant, il existe des différences dans les conditions d'approbation de ce type de plantes selon les pays. Comme conséquence de ces autorisations asynchrones, de faibles concentrations de matériel végétal à ADN recombiné ayant fait l'objet d'une évaluation de la sécurité sanitaire des aliments, conformément à la Directive du Codex régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné (CAC/GL 45-2003) (Directive du Codex sur les plantes) dans un ou plusieurs pays, peuvent parfois être présentes dans les aliments dans des pays importateurs où la sécurité sanitaire des plantes à ADN recombiné en question n'a pas été établie.

2. Cette annexe décrit l'approche recommandée pour évaluer la sécurité sanitaire des aliments en cas de présence à faible concentration de matériel végétal à ADN recombiné ou pour se préparer à une telle éventualité[24].

3. Cette annexe décrit également les systèmes de partage de données et d'informations pour faciliter l'utilisation de l'annexe et déterminer son applicabilité.

4. Cette annexe peut s'appliquer dans deux cas d'expositions par le régime alimentaire:

a) L'exposition à des produits tels que les céréales, les légumineux et les graines oléagineuses, qui au contact d'une variété non autorisée dans le pays importateur aurait pour effet probable de diluer de faibles concentrations à n'importe quel moment. Ceci serait l'éventualité la plus fréquente de présence à faible concentration de matériel végétal à ADN recombiné. Lorsqu'il est utilisé dans des denrées alimentaires traitées, un mélange, quel qu'il soit, même accidentel, de matériel dérivé de plantes à ADN recombiné ne serait présent qu'à faible dose dans une portion individuelle de nourriture pour les raisons suivantes: toute portion de céréales, de légumineux ou des graines oléagineuses proviendrait nécessairement de différentes plantes et d'exploitations agricoles multiples, ces types de produits sont ensuite mélangés dans des silos à grains, puis mélangés une fois de plus dans des cargaisons destinées à l'exportation, et à nouveau à l'importation.

b) L'exposition à des aliments généralement consommés entiers et non dilués, tels que certains fruits et légumes comme les pommes de terre, les tomates et les papayes, qui pourraient entrer en contact avec une forme non diluée de matériel végétal à ADN recombiné non autorisé même si de tels cas sont rares. Même si la probabilité de consommer un fruit ou un légume provenant d'une variété non autorisée est faible et la probabilité d'une consommation répétée encore plus faible, une telle consommation, quelle qu'elle soit, pourrait être la totalité d'un fruit ou d'un légume non autorisé.

5. Dans les deux cas, l'exposition par le régime alimentaire serait significativement plus faible que celle étudiée lors d'une évaluation de la sécurité sanitaire de la plante à ADN recombiné dans le respect de la Directive du Codex sur les plantes. Par conséquent, seuls certains éléments de la Directive du Codex sur les plantes conserveront leur pertinence et sont donc inclus dans cette annexe.

6. Cette annexe ne doit pas:

- porter sur les mesures de gestion des risques; les autorités nationales décideront quand le matériel végétal à ADN recombiné est présent en concentration suffisamment faible pour que cette annexe soit applicable;
- empêcher les autorités nationales d'effectuer une évaluation des risques dans le respect de la Directive du Codex sur les plantes; les pays peuvent décider quand et comment utiliser l'annexe dans le contexte de leurs systèmes réglementaires; ou
- annuler la responsabilité des industries, des exportateurs et, le cas échéant, des autorités nationales compétentes de continuer à répondre aux critères d'importation pertinents des pays, y compris en ce qui concerne le matériel à ADN recombiné non autorisé.

Section 2 – Considérations générales et autres

7. Pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments en cas de présence à faible concentration de matériel végétal à ADN recombiné dans les aliments, les sections 4 et 5 de la Directive du Codex sur les plantes s'appliquent, telles qu'elles sont amendées ci-après. Les paragraphes qui s'appliquent sont indiqués de manière spécifique. Les paragraphes de la Directive du Codex sur les plantes qui ne sont pas cités peuvent ne pas faire l'objet d'un examen.

24 Cette directive ne s'appliquera pas à une plante à ADN recombiné qui n'aura pas été autorisée dans un pays importateur à l'issue d'une évaluation de la sécurité sanitaire de l'aliment menée par ce pays.

Description de la plante à adn recombiné

8. Le paragraphe 22 de la Directive du Codex sur les plantes s'applique.

Description de la plante hôte et de son utilisation comme aliment

9. Les paragraphes 23, 24 et 25 de la Directive du Codex sur les plantes s'appliquent.

Description de l'organisme ou des organismes donneur(s)

10. 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. 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 et les allergènes 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 voies d'exposition autres que l'usage alimentaire prévu (par exemple, présence éventuelle en tant que contaminant)[25].

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

11. Les paragraphes 27, 28 et 29 de la Directive du Codex sur les plantes s'appliquent.

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

12. Les paragraphes 30 et 31 de la Directive du Codex sur les plantes s'appliquent.

13. Des informations devraient être fournies sur toutes les substances exprimées par la plante à ADN recombiné, notamment:

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 nouveau(x) caractère(s)
D) Les niveaux et site d'expression dans la plante du ou des produit(s) du gène exprimé et les niveaux de ses métabolites dans les parties comestibles de la plante; et
E) Lorsque c'est possible, la quantité du ou des produit(s) du gène cible si la fonction de(s) séquence(s)/gène(s) exprimé(s) doit modifier l'accumulation d'un ARNm endogène spécifique ou d'une protéine.[26]

14. Le paragraphe 33 de la Directive du Codex sur les plantes s'applique.

Évaluation de la sécurité sanitaire

Substances exprimées (substances qui ne sont pas des acides-nucléiques)

Évaluation de la toxicité éventuelle

15. L'évaluation de la sécurité sanitaire devrait tenir compte de la nature chimique et la fonction de la nouvelle substance exprimée et mesurer la concentration de la substance dans les parties comestibles de la plante à ADN recombiné, en incluant les valeurs moyennes et ses écarts-types.[27]

16. Les informations devraient être fournies pour s'assurer que les gènes d'organisme(s) donneur(s) codant pour des toxines connues présents dans le ou les organisme(s) donneur(s) ne sont pas transférés à des plantes à ADN recombiné qui n'expriment pas normalement ces caractéristiques toxiques. Cette garantie est particulièrement importante dans les cas où une plante à ADN recombiné est préparée différemment du végétal donneur, étant donné que les techniques de transformation alimentaire habituellement associées à l'organisme donneur peuvent désactiver; dégrader ou éliminer les substances toxiques.[28]

17. Le paragraphe 37 de la Directive du Codex sur les plantes s'applique.

18. Dans le cas de protéines, l'évaluation de la toxicité potentielle devrait se focaliser sur les similarités des séquences d'acides aminés entre la protéine d'une part et les protéines toxiques connues d'autre part, ainsi que sur

25 Le texte de ce paragraphe a été adapté du paragraphe 26 de la Directive du Codex sur les plantes.

26 Le texte de ce paragraphe a été adapté du paragraphe 32 de la Directive du Codex sur les plantes.

27 Le texte de ce paragraphe a été adapté du paragraphe 35 de la Directive du Codex sur les plantes.

28 Le texte de ce paragraphe a été adapté du paragraphe 36 de la Directive du Codex sur les plantes.

leur stabilité à la chaleur ou au processus de transformation et à la dégradation dans des modèles de simulation représentatifs des conditions gastriques et intestinales. Des études de toxicité orale[29] appropriées peuvent être nécessaires dans le cas où la protéine présente dans l'aliment n'est pas similaire à des protéines précédemment consommées sans incidents dans les aliments, et en tenant compte de sa fonction biologique quand elle est connue.[30]

19. Les paragraphes 39 et 40 de la Directive du Codex sur les plantes s'appliquent.

Évaluation de l'allergénicité potentielle (protéines)

20. Les paragraphes 41, 42, 43 de la Directive du Codex sur les plantes s'appliquent.

Analyses des principales substances toxiques et des allergènes

21. Des analyses de concentration des principales substances toxiques[31] et des allergènes sont importantes dans certains cas de plantes à ADN recombiné (par exemple, ceux qui sont généralement consommés entiers et non dilués, tels que les pommes de terre, les tomates et les papayes). Les analyses des concentrations des principales substances toxiques et des allergènes de la plante à ADN recombiné caractéristiques de l'aliment devraient être comparées à une analyse équivalente d'un produit traditionnel de référence cultivé et récolté dans les mêmes conditions. La signification statistique de toute différence observée devrait être évaluée dans le contexte de la gamme de la variation naturelle du paramètre analysé pour déterminer sa signification biologique. Le(s) référentiel(s) utilisé(s) dans cette évaluation devrai(en)t être idéalement une lignée parentale la plus proche de l'isogénie. En pratique, cela peut ne pas être possible dans tous les cas, il faudra alors choisir la lignée la plus proche possible. Le but de cette comparaison est d'établir que des substances qui peuvent affecter la sécurité sanitaire de l'aliment n'ont pas été altérées de telle façon qu'elles auraient un impact néfaste sur la santé humaine.[32]

22. La localisation des sites d'essais devrait être représentative de la gamme de conditions environnementales dans laquelle cette variété de plante est censée être cultivée. Le nombre de sites d'essais devrait être suffisant pour permettre une évaluation précise des principales substances toxiques et des allergènes dans l'ensemble de ces conditions. De même, les essais devraient être conduits sur un nombre de générations suffisant pour permettre une exposition conforme à la variété des conditions rencontrées dans la nature. Afin de minimiser les effets environnementaux, et pour réduire les effets de variations génotypiques survenant naturellement au sein d'une variété cultivée, chaque site d'essais devrait être répliqué. Un nombre adéquat de plantes devraient être échantillonnées et les méthodes d'analyse devraient être suffisamment sensibles et spécifiques pour détecter des variations des principales substances toxiques et des allergènes.[33]

Évaluation des métabolites

23. Certaines plantes à ADN recombiné peuvent avoir été modifiées de telle sorte qu'il pourrait en résulter des nouveaux métabolites ou des modifications des niveaux de divers métabolites dans l'aliment. Dans certains cas d'aliments dérivés de plantes à ADN recombiné (par exemple, ceux qui sont généralement consommés entiers et non dilués), une attention particulière devrait être portée à l'accumulation potentielle, dans les aliments, de métabolites qui pourraient avoir un effet néfaste sur la santé humaine. L'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments en cas de présence à faible concentration de matériel à ADN recombiné nécessite l'investigation des niveaux de résidus et de métabolites dans l'aliment. Lorsque des modifications de niveaux de résidus ou de métabolites sont identifiés dans les aliments, une attention particulière doit être donnée aux effets éventuels sur la santé humaine en utilisant les procédures classiques d'établissement de la sécurité sanitaire de tels métabolites (par exemple, procédures pour évaluer l'innocuité des produits chimiques dans les aliments pour la santé humaine).[34]

Transformation des aliments

24. Les éventuels effets de la transformation des aliments, y compris une préparation à domicile, effectuée sur des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné devraient être considérés. Par exemple, des changements peuvent survenir en ce qui concerne la stabilité à la chaleur d'un produit toxique endogène. De ce fait, des informations décrivant les conditions de transformation appliquées dans la production d'un aliment à partir de la plante

29 Des directives relatives à la toxicité orale ont été élaborées dans des forums internationaux comme par exemple *Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*.

30 Le texte de ce paragraphe a été adapté du paragraphe 38 de la Directive du Codex sur les plantes.

31 Les principales substances toxiques sont les composés toxicologiquement significatifs connus et présents naturellement dans la plante, comme les composés dont la toxicité potentielle et les concentrations peuvent influer significativement sur la santé (par exemple, la solanine des pommes de terre si sa concentration augmente).

32 Le texte de ce paragraphe a été adapté du paragraphe 44 de la Directive du Codex sur les plantes.

33 Le texte de ce paragraphe a été adapté du paragraphe 45 de la Directive du Codex sur les plantes.

34 Le texte de ce paragraphe a été adapté du paragraphe 46 de la Directive du Codex sur les plantes.

devraient être fournies. Par exemple, dans le cas d'huiles végétales, des informations devraient être fournies sur le processus d'extraction et les étapes de raffinage consécutives.[35]

Accumulation potentielle de substances significatives pour la santé humaine

25. Certaines plantes à ADN recombiné peuvent présenter des traits (par exemple, une tolérance à un herbicide) qui peuvent conduire indirectement à une accumulation potentielle de résidus de pesticides, de métabolites dégradés de ces résidus, de métabolites toxiques, de contaminants ou d'autres substances qui peuvent être néfastes pour la santé humaine. Dans certains cas d'aliments dérivés de plantes à ADN recombiné (par exemple, ceux qui sont généralement consommés entiers et non dilués), l'évaluation des risques devrait prendre en compte ce potentiel d'accumulation. Les procédures traditionnelles pour établir la sécurité sanitaire de ces composés (par exemple, pour l'évaluation de la sécurité des produits chimiques pour l'homme) devraient être appliquées.[36]

Utilisation de gènes marqueurs de résistance aux antibiotiques

26. Les paragraphes 55, 56, 57 et 58 de la Directive du Codex sur les plantes s'appliquent.

Section 3 – directive sur le partage des données et des informations

27. Pour utiliser cette annexe, les pays membres du Codex devront avoir accès à des données et informations essentielles.

28. Les pays membres du Codex devraient fournir des informations sur les plantes à ADN recombiné autorisées à une base de données centrale accessible à tous, qui serait mise à jour par la FAO, conformément à la Directive du Codex sur les plantes. Ces informations devraient être présentées selon le format suivant:

a) le nom du demandeur du produit;
b) le résumé de la demande;
c) le pays accordant l'autorisation;
d) la date d'autorisation;
e) le champ d'application de l'autorisation;
f) l'identificateur unique;
g) des liens vers les informations sur le même produit contenues dans d'autres bases de données tenues à jour par des organisations internationales pertinentes, selon qu'il conviendra;
h) le résumé de l'évaluation de la sécurité sanitaire, qui doit être conforme à la structure de l'évaluation de la sécurité sanitaire figurant dans la Directive du Codex sur les plantes;
i) le lieu où les protocoles pour une méthode de détection et le matériel de référence approprié (non viable ou dans certains cas viable), adaptés à des situations de faible concentration, peuvent être obtenus;[37]
j) les coordonnées des autorités compétentes en charge de l'évaluation de la sécurité sanitaire et du demandeur du produit.

29. Ce processus devrait faciliter l'accès rapide des membres du Codex importateurs à des informations complémentaires pertinentes pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dans des cas de faible concentration de matériel végétal à ADN recombiné, conformément à cette annexe.

30. Les membres du Codex accordant l'autorisation devraient fournir des informations complémentaires aux autres pays membres du Codex sur son évaluation de la sécurité sanitaire selon la Directive du Codex sur les plantes et en conformité avec son cadre règlementaire/juridique.

31. Le demandeur du produit devrait fournir les informations et les éclaircissements nécessaires permettant la poursuite de l'évaluation conformément à cette annexe ainsi qu'un protocole validé spécifique à un évènement ou une méthode de détection spécifique à un caractère adapté à une situation de faible concentration et le matériel de référence approprié (non viable ou dans certains cas viable) sans préjudice des préoccupations légitimes quant à la confidentialité des informations commerciales et industrielles.

32. Le cas échéant, toutes nouvelles informations scientifiques pertinentes quant aux conclusions de l'évaluation de la sécurité sanitaire, conduite conformément à la Directive du Codex sur les plantes, devraient être fournies par le membre du Codex accordant l'autorisation ●

35 Le texte de ce paragraphe a été adapté du paragraphe 47 de la Directive du Codex sur les plantes.

36 Le texte de ce paragraphe a été adapté du paragraphe 54 de la Directive du Codex sur les plantes.

37 Cette information peut être fournie par le demandeur du produit ou dans certains cas par les membres du Codex.

Partie 2

Outils et techniques à l'intention des formateurs

89 12. Préparation et tenue d'un atelier

89 Préparation de l'atelier

?? L'animateur de l'atelier

?? Ordre du jour de l'atelier

?? Evaluation de l'atelier et certificats

?? Présentations de l'atelier

101 Supports visuels

101 Module 1. Aperçu de l'Atelier

103 Module 2. Concepts et principes de l'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM

108 Module 3. L'approche et le cadre de l'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM

111 Module 4. Caractérisation de la ou des modification(s) génétique(s), évaluation de la toxicité et de l'allergénicité potentielles et analyse de la composition

114 Module 5. Communication sur les risques et décisions en matière de sécurité sanitaire

12. Préparation et tenue d'un atelier

Préparation de l'atelier

Le succès d'un atelier est généralement fonction des efforts investis dans sa préparation. Voici quelques-unes des principales tâches que pourraient envisager les organisateurs de l'atelier lors de la phase préparatoire.

1. Obtenir la confirmation que les ressources financières requises seront fournies et accessibles au moment voulu. Obtenir le soutien institutionnel et administratif nécessaire pour gérer l'atelier, y compris l'établissement d'un budget réaliste et des mesures de contrôle des coûts pour éviter la corruption ainsi que des accords écrits concernant l'audit et les mesures de contrôle des coûts.
2. Identifier le(s) but(s) de l'atelier. Ceci peut prendre la forme d'une déclaration d'intentions ou d'objectifs, d'un ordre du jour et/ou d'un document de travail indiquant les questions clés, ainsi que les références et les ressources, que les participants pourraient souhaiter étudier pour se préparer à l'atelier. Les buts de l'atelier pourraient être les suivants:
   - Introduction, visant à présenter aux participants les concepts et principes servant de cadre à l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné, avant leur mise sur le marché.
   - Présentation aux participants des types d'information et de données qu'ils pourraient être appelés à évaluer dans leurs fonctions d'évaluateurs de la sécurité sanitaire, au moyen d'études de cas portant sur des produits approuvés pour la consommation humaine dans un certain nombre de pays.
   - Mise en exergue du caractère multidisciplinaire de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné, au moyen d'exercices pratiques destinés à simuler les travaux à effectuer, dans le cadre d'un travail commun.
3. Déterminer le nombre de personnes que l'atelier de formateurs pourra accueillir. Le nombre de personnes invitées déterminera en partie le processus le plus approprié par rapport à l'objectif annoncé. Les ateliers d'évaluation de la sécurité sanitaire de type itératif, où l'on donne aux participants des activités ou des exercices de groupe à faire, sont beaucoup plus efficaces que les séminaires ou les conférences de type plus classique, où les participants reçoivent des informations de manière passive. Pour maximiser l'efficacité de la formation, il est conseillé de limiter le nombre de participants à une vingtaine.
4. La sélection des participants est déterminante pour le succès d'un atelier d'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM, d'où l'importance d'identifier avec soin les personnes qu'il est préférable d'inviter, compte tenu des objectifs de l'atelier. S'il est parfois possible d'inviter directement et individuellement des responsables de la règlementation ou des scientifiques à l'atelier, il vaut généralement mieux respecter la hiérarchie et envoyer des lettres d'invitation au directeur ou au dirigeant d'une institution particulière, pour l'inviter à désigner un ou plusieurs délégués qui participeront à l'atelier. Afin d'aider cette personne à sélectionner au mieux le ou les participants, il peut être utile de joindre un cadre de référence décrivant clairement le niveau de formation et d'expérience professionnelle requis (voir modèle ci-dessous).

Fiche 12.1. Cadre de référence pour la sélection des participants

Récapitulatif pour le profil souhaité

- ❑ Expérience en tant que responsable de la règlementation ou chercheur dans le domaine des biotechnologies agricoles ou dans une discipline en rapport avec l'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM, telle que biologie moléculaire; phytogénétique, biochimie, immunologie, toxicologie, nutrition humaine ou animale.
- ❑ Expérience de travail dans un contexte multidisciplinaire avec des personnes de nationalité, d'ethnie et de culture différentes.
- ❑ Bonne connaissance de l'outil informatique, de la communication d'informations en ligne et de la recherche documentaire.
- ❑ Expérience d'activités de recherche-développement dans les secteurs public et privé.
- ❑ Publications d'articles dans la littérature scientifique et dans la presse d'intérêt plus général.
- ❑ Aptitudes de communication et de présentation, en particulier devant des publics variés.
- ❑ Diplôme universitaire de troisième cycle en sciences biologiques ou agronomiques ou combinaison équivalente de formation et d'expérience.
- ❑ Excellentes capacités d'expression écrite/orale.

5. Déterminer la manière appropriée d'inviter les participants à l'atelier, par lettre ou par téléphone, directement ou par l'entremise de quelqu'un de plus haut placé dans la hiérarchie de l'organisation. La réponse dépend généralement de facteurs tels que:
   a. les décisions des organisateurs de l'atelier concernant son objectif;
   b. le niveau hiérarchique à partir duquel les organisateurs souhaitent attirer les participants;
   c. les relations que les organisateurs ont ou n'ont pas déjà établies avec les participants potentiels;
   d. le pouvoir de décision des invités eux-mêmes quant à l'opportunité de leur participation.
6. Prévoir un délai suffisant entre la réception d'une invitation et l'événement lui-même, pour éviter des conflits avec d'autres engagements déjà prévus. Il faut aussi prévoir du temps pour régler les formalités relatives aux voyages, notamment les demandes de visas d'entrée qui, dans certains pays peuvent prendre plusieurs mois.
7. Mettre à disposition toute la documentation de référence pertinente pour qu'elle puisse être examinée à l'avance. Cette documentation pourrait comprendre:
   - Les Principes du Codex pour l'analyse des risques liés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes (Annexe 1);
   - La Directive du Codex régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné (Annexe 2);
   - Un choix d'études de cas;
   - Les principales références, en particulier celles intéressant le pays ou la région où se déroule l'atelier
8. Identifier un lieu et une date appropriés pour la tenue de l'atelier. Si les participants viennent de loin, l'atelier doit se tenir à proximité de lieux d'hébergement adéquats. Les autres aspects à prendre en considération sont les suivants.
   a. Si les travaux en petits groupes tiennent une place importante dans le programme de l'atelier, le lieu choisi doit avoir un nombre de salles suffisant.
   b. Les salles réservées aux travaux de groupe doivent être équipées de chevalets de tableaux de présentation, de papier et de marqueurs, pour faciliter le travail et les discussions de groupe.
   c. La salle plénière doit être équipée du matériel nécessaire pour que les participants puissent faire leurs exposés. En général, il faut un projecteur LCD ou un rétroprojecteur et un grand écran.

Fiche 12.2. Liste récapitulative pour la préparation d'un atelier

- ❑ Identifier des sources de financement appropriées pour l'atelier et préparer des accords écrits concernant ses objectifs, sa taille et sa structure. Toutes les questions d'ordre financier ou administratif doivent être précisées par écrit, y compris la manière dont les ressources financières seront gérées.
- ❑ S'assurer qu'une vérification appropiée sera effectuée et préciser exactement quels types de dépenses couvrira le budget de l'atelier. Le plus souvent, il faut une personne à plein temps, commençant au moins deux mois avant l'atelier, pour s'occuper de toutes les questions pratiques.
- ❑ Tenir des réunions préalables, au cours desquels vous devrez:
  - ❍ identifier les principaux collaborateurs et leurs contributions (institut d'accueil, organisations parrainantes, etc.);
  - ❍ identifier le ou les animateurs;
  - ❍ dresser une liste des participants potentiels;
  - ❍ choisir une date pour la tenue de l'atelier;
  - ❍ établir une liste d'orateurs potentiels pour chacune des sessions où il en faut un.
- ❑ Estimer les coûts de l'atelier et la répartition des coûts entre les partenaires, si approprié.
- ❑ Envoyer les invitations au moins trois semaines à l'avance, s'il s'agit d'un atelier national. Pour les ateliers internationaux, il est absolument indispensable de prévenir au moins deux mois à l'avance. Si les frais de voyage sont couverts par les organisateurs, des instructions claires doivent être données par écrit concernant la classe de tarif, le plafond des dépenses et le coût de la documentation.
- ❑ Identifier et réserver un lieu pour la tenue de l'atelier, qui (dans l'idéal) possède:
  - ❍ une salle plénière suffisamment grande pour accueillir tous les participants;
  - ❍ des salles pour les réunions en petits groupes, ou une salle suffisamment grande pour que des petits groupes puissent y travailler sans se déranger;
  - ❍ des possibilités d'hébergement sur place.
- ❑ Prendre des dispositions avec un fournisseur d'aliments et de boissons pour les déjeuners et les pauses. Tenir compte des besoins ou des préférences alimentaires s'il s'agit d'ateliers internationaux, dans lesquels des considérations culturelles ou religieuses peuvent entrer en jeu.
- ❑ Parachever l'ordre du jour et confirmer la présence des intervenants, et spécifier par écrit l'appui financier auquel ils auront droit (voyage, hébergement, honoraires, etc.).
- ❑ Tenir une réunion de formation d'animateurs de petits groupes une semaine avant l'atelier, si des sessions par petits groupes sont prévues.
- ❑ Rassembler l'équipement et le matériel nécessaires avant l'atelier:
  - ❍ blocs-notes et stylos pour les participants;
  - ❍ blocs de papiers pour tableaux à feuilles mobiles et marqueurs;
  - ❍ badges nominatifs;
  - ❍ photocopies de tous les documents à distribuer.
- ❑ Obtenir des rétroprojecteurs et des projecteurs LCD, ainsi que du matériel de rechange, et s'assurer de la disponibilité d'une assistance technique avant et pendant l'atelier.

d. Selon la taille du groupe, des haut parleurs et des «microphones sur pied» mobiles peuvent être nécessaires pour permettre aux participants de poser des questions et d'entendre les réponses.
e. Dans l'idéal, la salle plénière devrait être aménagée de façon à ce que tous les participants puissent être assis autour de petites tables pour pouvoir interagir pendant et après les présentations. Ceci est particulièrement important si les petits groupes ne peuvent pas se réunir dans une salle séparée et doivent travailler dans la salle plénière.

Les organisateurs pourraient utiliser et/ou adapter la liste récapitulative ci-dessous, pour préparer leur atelier.

L'animateur de l'atelier

Comme l'animateur doit servir de guide tout au long de l'atelier, il doit avoir d'excellentes capacités d'organisation et de direction. Dans le cas d'ateliers de formation sur l'évaluation

Fiche 12.3. Modèle d'ordre du jour pour un atelier de 3 jours

Ordre du jour de l'Atelier sur l'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM

Lieu _____

Date _____

Jour 1

8.00	Enregistrement	
9.00	Ouverture, accueil des participants	
Introduction de l'atelier		
9.15	**Présentation 1:** aperçu de l'atelier	Module de présentation 1
9.30	Présentation des participants et des formateurs	
Partie I: Concept de l'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM et perspectives Internationales		
9.45	**Présentation 2:** Concepts et principes de l'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM, principales initiatives internationales	Module de présentation 2 Ch. 2
10.30	*Pause café*	
11.00	Présentation de trois études de cas • Évènement de transformation MON 810 – maïs génétiquement modifié résistant aux insectes • Soja GM à haute teneur en acide oléique • Soja GM résistant aux herbicides	
12.00	Assignation des tâches aux groupes de travail	
12.30	*Déjeuner*	
Partie II: Approche et cadre, identification des informations requises		
13.30	**Présentation 3:** Approche comparative et cadre de l'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM	Module de présentation 3 Ch. 3–4
14.30	**Session 1 du Groupe de travail.** À l'aide des études de cas, identifier la description des éléments suivants, et déterminer si les informations correspondantes sont suffisantes: • Description de la plante à ADN recombiné • Description de la plante-hôte et de son utilisation comme aliment • Description du ou des organisme(s) donneur(s) • Description de la (des) modification(s) génétique(s)	
15.30	*Pause café*	
16.00	**Session plénière 1.** Compte-rendu et discussion de la Session 1 du GT	
17.30	Synthèse et conclusions du Jour 1	

(Suite)

Fiche 12.3. (fin)

Jour 2

Partie III: Toxicité et allergénicité potentielles et analyse de la composition		
9.00	**Présentation 4:** Caractérisation de la ou des modification(s) génétique(s), évaluation de la toxicité éventuelle et de l'allergénicité potentielle, et analyse de la composition des principaux constituants	Module de présentation 4 Ch. 5–8
10.00	**Session 2 du Groupe de travail.** A l'aide des études de cas, évaluer la toxicité éventuelle	
10.30	*Pause café*	
11.00	Session 2 du Groupe de travail, suite	
12.00	*Déjeuner*	
13.00	**Session plénière 2.** Compte-rendu et discussion de la Session 3 du GT	
14.00	**Session 3 du Groupe de travail.** A l'aide des études de cas, évaluer l'allergénicité potentielle	
15.30	*Pause café*	
16.00	**Session plénière 3.** Compte-rendu et discussion de la Session 4 du GT	
17.30	Synthèse et conclusions du Jour 2	

Jour 3

9.00	**Session 4 du Groupe de travail.** A l'aide des études de cas, identifier et évaluer l'analyse de la composition	
10.30	*Pause café*	
11.00	**Session plénière 4:** Compte-rendu et discussion de la Session 5 du GT et de l'ensemble des sessions du GT	
12.30	*Déjeuner*	
Part IV: Communication sur les risques		
13.30	**Présentation 5:** Communication sur les risques et décisions en matière de sécurité sanitaire	Module de présentation 5 Ch. 10
14.30	Session 5 du Groupe de travail: À l'aide des études de cas: • donner une définition stratégique de la communication sur les risques; • préparer un exposé des décisions à l'intention du grand public	
15.30	*Pause café*	
16.00	**Session plénière 5:** Compte-rendu et discussion de la Session 6 du GT	
17.30	• Évaluation de l'atelier • Certificats • Remarques de conclusion • Clôture de l'ateli	

de la sécurité sanitaire des AGM, ce rôle incombe souvent à l'organisateur de l'atelier. Voici quelques conseils pratiques pour faciliter les ateliers.

- Les participants aiment bien que les horaires de début et de fin soient respectés. Veillez à prévoir suffisamment de temps pour l'enregistrement des participants au début de l'atelier afin que cette opération puisse être terminée avant l'ouverture des séances. De même, des fiches d'évaluation doivent être remises aux participants suffisamment de temps avant la fermeture de l'atelier pour qu'ils puissent les remplir et les remettre avant de partir.
- S'assurer qu'il y a un tableau des inscrits pour aider les participants à leur arrivée. Fournir une fiche indiquant les noms, l'organisation, le lieu d'affectation et les coordonnées de chaque personne. Distribuer des bages nominatifs.
- Veiller à ce qu'une liste des participants soit remplie et distribuée avant la fin de l'atelier. Éventuellement, demander aux participants de vérifier l'exactitude des informations fournies avant leur départ.
- Tenir les personnes qui ont des exposés à faire et les participants informés du point de l'ordre du jour en cours. Si l'atelier se déroule deux jours ou plus, annoncer le programme du jour au début de chaque journée.
- Veiller à ce que tout le matériel nécessaire pour les présentations soit disponible et prêt à l'emploi. Si les présentations sont en version PowerPoint ou analogue, veiller à ce qu'elles soient téléchargées et sauvegardées sur un ordinateur chaque jour avant le début des présentations.
- Décrire brièvement une activité spécifique de l'atelier avant de demander aux participants de commencer leur travail de groupe ou leurs exercices.
- Se déplacer de groupe en groupe pour se faire une idée de la teneur des discussions et aider à clarifier toutes les questions que les participants peuvent se poser. Selon le nombre de participants à l'atelier, il peut être utile d'en inciter certains à intervenir en tant qu'animateurs de petits groupes.
- Surveiller l'heure et prévenir à l'avance les participants du temps qu'il leur reste pour achever une activité spécifique.
- Veiller à ce que suffisamment de temps soit consacré à la discussion. Les participants apprennent souvent plus les uns des autres que des conférenciers !

L'animateur ne doit pas nécessairement avoir réponse à tout, mais les participants s'adresseront à lui pour qu'il les guide dans l'étude d'une question afin qu'ils parviennent à une réponse appropriée. Les animateurs doivent y être préparés. Dans chaque session, il devrait y avoir un modérateur pour chaque session, pour faciliter et guider la discussion.

Ordre du jour de l'atelier

Il est essentiel de définir un ordre du jour efficace pour concevoir un atelier constructif. L'ordre du jour communique des informations concernant:

- les thèmes des discussions;
- la personne qui présente chaque thème;
- le temps imparti pour chaque thème:
- l'objectif de la séance.

Les présentations et les réunions en petits groupes devraient porter sur les processus d'évaluation de la sécurité sanitaire, et plus particulièrement sur:

- la description de la plante à ADN recombiné;
- la description de la plante-hôte et son utilisation comme aliment;
- la description du ou des organisme(s) donneur(s);
- la caractérisation de la ou des modification(s) génétique(s);
- l'évaluation de la sécurité sanitaire:
  - substances exprimées (substances autres qu'acides nucléiques);

Encart 12.1. Élaborer un ordre du jour efficace

1. Élaborer un ordre du jour pour l'atelier prévoyant:
   - une vingtaine de participants ayant des niveaux de compétence différents;
   - des présentations des principes et des critères de l'évaluation de la sécurité sanitaire basés sur la Directive du Codex régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné;
   - des activités/exercices de groupe, fondées sur des études de cas, donnant une expérience pratique de l'évaluation de la sécurité sanitaire de ces produits.
2. Selectionner des études de cas appropriées pour l'atelier.
   - Se prêtent-elles à une formation?
     - Choisir un exemple clair et simple;
   - Sont-elles faisables, dans le laps de temps prévu pour l'atelier?
     - Il faut au moins 15 minutes pour présenter l'étude de cas au début de l'atelier
     - Il faut au moins 1 heure pour une session de discussion en petits groupes
     - Il faut aussi au moins 1 heure pour faire un compte rendu de session.

Encart 12.2. Mise au point de l'évaluation d'un atelier

1. Faites la liste des principaux objectifs de votre atelier.
2. Définissez des paramètres (notations, types de réponses possibles, questions ouvertes) pour déterminer si les objectifs ont été atteints.
3. Formulez des questions, en vous référant aux points 1 et 2 ci-dessus, compte tenu de ce qui suit:
   - le nombre approprié de questions se situe entre 5 et 10;
   - prévoyez toujours un espace pour d'éventuelles observations;
   - prévoyez 15 minutes pour remplir les formulaires et 5 minutes pour les ramasser.

- analyses de composition en constituants essentiels;
- évaluation des métabolites;
- procédés de transformation de l'aliment;
- modifications nutritionnelles;
- autres considérations.

Le document qui suit est un modèle d'ordre du jour que les organisateurs pourraient souhaiter reprendre et/ou adapter pour la préparation de leur atelier.

Evaluation de l'atelier et certificats

Évaluation

Il est important d'obtenir les impressions des participants sur leur expérience durant l'atelier, et sur la manière dont ils pensent mettre à profit l'information. Une fiche d'évaluation de l'atelier devrait être distribuée avant sa clôture. Voici un modèle de fiche d'évaluation que les organisateurs peuvent souhaiter reprendre ou adapter pour la préparation de leur atelier.

ASTUCE: Afin de s'assurer que tous les participants remplissent une fiche d'évaluation, les organisateurs pourraient envisager de décerner des certificats de participation. Les participants ne se verraient décerner le certificat qu'après avoir rempli et rendu la fiche d'évaluation. Il est important que l'évaluation soit faite avant la clôture de l'atelier.

Certificats

Les certificats peuvent être utilisés comme récompense pour attester que le stagiaire a suivi l'atelier jusqu'au bout et promouvoir une participation active.

Le certificat devrait avoir une seule page et contenir des informations succinctes sur l'organisateur (non FAO), la date, la durée, le lieu et les thèmes du stage. Il devrait en outre indiquer les noms et prénoms complets du participant, spécifier que ce dernier a suivi le stage de formation, être signé et, le cas échéant, muni d'un tampon.

Fiche 12.4. Modèle de fiche d'évaluation d'un atelier

Fiche d'évaluation de l'atelier

Titre de l'atelier _____
Lieu _____
Date _____

Nous vous serions très reconnaissants de bien vouloir remplir ce questionnaire.
Vos réponses nous seront utiles pour planifier les évènements à venir et elles aideront les organisateurs et les conférenciers à améliorer leur matériel et leurs présentations.

Appréciation globale

De manière générale, comment évalueriez-vous ce cours?

- ☐ Excellent
- ☐ Bon
- ☐ Moyen
- ☐ Passable
- ☐ Faible

Objectifs de l'atelier

En vous référant à liste ci-dessous des objectifs de cet atelier, veuillez indiquer si vous estimez qu'ils ont été atteints, par une note allant de 1 à 5, sachant que la note 1 signifie que l'objectif n'a pas été atteint, alors que la note 5 signifie qu'il a été pleinement atteint.

Objectif 1: [Saisir ici l'objectif]
☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

Objectif 2: [Saisir ici l'objectif]
☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

Objectif 3: [Saisir ici l'objectif]
☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

Page 1

(Suite)

Fiche 12.4 (suite)

Thèmes

Dans cette section, nous vous invitons à noter le contenu, l'utilité, les supports de formation (diapositives, documents de travail, etc.) et la gestion du temps de chaque présentation. Pour évaluer le contenu, vous devrez prendre en considération des facteurs comme la rigueur du matériel (théorie, pertinence et méthologie). Concernant l'utilité, vous devez noter le thème en fonction de son applicabilité et de sa pertinence par rapport aux objectifs de l'atelier. Les facteurs entrant en jeu dans l'évaluation de la présentation incluent la clarté, la logique de la structure, l'utilisation appropriée des supports visuels, etc. Veuillez cocher la case qui reflète le mieux votre opinion sur ces facteurs.

	Contenu					*Utilité*					*Présentation*					*Gestion du temps*				
Jour 1	*Excellent*	*Bon*	*Moyen*	*Passable*	*Faible*	*Excellent*	*Bon*	*Moyen*	*Passable*	*Faible*	*Excellent*	*Bon*	*Moyen*	*Passable*	*Faible*	*Excellent*	*Bon*	*Moyen*	*Passable*	*Faible*
Présentation 1 (saisir le titre)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Présentation 2 (saisir le titre)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Présentation 3 (saisir le titre)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Activité 1 (saisir le titre)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Activité 2 (saisir le titre)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

	Contenu					*Utilité*					*Présentation*					*Gestion du temps*				
Jour 2	*Excellent*	*Bon*	*Moyen*	*Passable*	*Faible*	*Excellent*	*Bon*	*Moyen*	*Passable*	*Faible*	*Excellent*	*Bon*	*Moyen*	*Passable*	*Faible*	*Excellent*	*Bon*	*Moyen*	*Passable*	*Faible*
Présentation 1 (saisir le titre)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Présentation 2 (saisir le titre)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Présentation 3 (saisir le titre)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Activité 1 (saisir le titre)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Activité 2 (saisir le titre)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

(Suite)

Fiche 12.4 (suite)

Points forts et points faibles

Veuillez énumérer les trois principaux **points forts** de ce stage, selon vous.

1.

2.

3.

Veuillez énumérer les trois principaux **points faibles** de ce stage, selon vous.

1.

2.

3.

Page 3

(Suite)

Fiche 12.4 (Fin)

Thèmes supplémentaires

Quels thèmes supplémentaires aurait-on dû inclure dans ce stage?
– et quels thèmes aurait-il fallu exclure à cette fin?

Logistique

Appui préalable	☐ Excellente	☐ Bon	☐ Moyen	☐ Passable	☐ Faible
Hébergement	☐ Excellente	☐ Bon	☐ Moyen	☐ Passable	☐ Faible
Repas	☐ Excellente	☐ Bon	☐ Moyen	☐ Passable	☐ Faible
Organisation et gestion	☐ Excellente	☐ Bon	☐ Moyen	☐ Passable	☐ Faible

Autres observations

Veuillez nous faire part de vos éventuelles observations ou suggestions dans l'espace ci-dessous.

Page 4

Présentations de l'atelier

Supports visuels

Les supports visuels devraient être clairs, simples et utiles à la présentation. Les diapositives ou les transparents sont des auxiliaires utiles durant la présentation; le public devrait être guidé grâce aux points clés sur chaque support visuel. Les transparents ou les diapositives ne présentant pas d'intérêt pour le stage devraient être écartés. L'utilisation d'un trop grand nombre de supports visuels peut distraire le public et lui faire perdre le fil de l'exposé.

Modules de formation

Les modèles de présentations suivants peuvent être utiles aux organisateurs, aux animateurs ou aux formateurs lors de la préparation d'un atelier. Les modules figurent en version électronique dans un CD-ROM qui contient aussi d'autres matériels de référence pertinents ●

Supports visuels Module 1

Aperçu de l'Atelier

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Module de présentation 1

Aperçu de l'Atelier

Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Objectifs de l'Atelier

- **Faciliter la mise en œuvre** des principes et directives **internationalement reconnus**
- Partager les **expériences des méthodes de réglementation et d'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments, entre de nombreux pays**

Module 1 / diapositive 2

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Portée de l'Atelier

Former des experts (formation de formateurs) pour animer des ateliers visant à:

- **améliorer les capacités des autorités réglementaires**
- **évaluer, gérer** et **communiquer** les risques liés aux aliments dérivés de plantes à ADN recombiné

Module 1 / diapositive 3

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Présentations

- Concepts et principes de l'évaluation de la sécurité sanitaire
- Approche et cadres de l'évaluation de la sécurité sanitaire
- Évaluation de la toxicité éventuelle, de l'allergénicité potentielle et analyses de la composition
- Communication sur les risques et considérations de politique publique

Module 1 / diapositive 4

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Sessions du Groupe de travail

- Des réunions en petits groupes, avec des études de cas, permettront aux participants de faire des travaux pratiques sur la préparation et la conduite d'ateliers de formation
- Sujets des études de cas:
  - le maïs MON 810
  - le soja GTS 40-3-2
  - le soja à haute teneur en acide oléique

Module 1 / diapositive 5

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Résultats escomptés

L'Atelier fournit:

- une vue d'ensemble des perspectives internationales concernant la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné (Codex et FAO/OMS)
- une expérience théorique et pratique de la méthodologie d'évaluation de la sécurité sanitaire
- des informations pratiques sur l'organisation et l'exécution des ateliers de formation

(*suite*)

Module 1 / diapositive 6

Supports visuels Module 1 (fin)

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Résultats escomptés *(fin)*

Des responsables qualifiés peuvent:

- Renforcer la sécurité sanitaire des aliments, et ce faisant, non seulement améliorer la santé des consommateurs, mais aussi garantir la sécurité sanitaire des aliments mis sur le marché international

Module 1 / diapositive 7

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Programme: Jour 1 – matin

9.15	**Présentation 1.** Aperçu de l'Atelier
9.30	Présentation des participants et des formateurs
9.45	**Présentation 2.** Concepts et principes de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques, principales initiatives internationales (CODEX, FAO/OMS, OCDE, etc.)
10.30	*Pausé café*
11.00	Présentation des trois études de cas: • Évènement de transformation MON 810 – maïs génétiquement modifié résistant aux insectes • Soja à haute teneur en acide oléique • Soja transgénique résistant aux herbicides
12.00	Tâches des groupes de travail
12.30	*Déjeuner*

Module 1 / diapositive 8

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Programme: Jour 1 – après-midi

13.30	**Présentation 3.** Approche comparative et cadre de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques
14.30	**Session 1 du Groupe de travail.** À l'aide des études de cas, identifier la description des éléments suivants, et déterminer si les informations correspondantes sont suffisantes: • Description de la plante à ADN recombiné • Description de la plante-hôte et de son utilisation comme aliment • Description du ou des organisme(s) donneur(s) • Description de la (des) modification(s) génétique(s)
15.30	*Pause café*
16.00	**Session plénière 1.** Compte-rendu et discussion de la Session 1 du GT
17.30	Synthèse et conclusion du Jour 1

Module 1 / diapositive 9

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Programme: Jour 2

9.00	**Présentation 4.** Caractérisation de la ou des modification(s) génétique(s), évaluation de la toxicité éventuelle et de l'allergénicité potentielle, et analyse de la composition des principaux constituants
10.00	**Session 2 du Groupe de travail.** Évaluer la toxicité éventuelle
12.00	*Déjeuner*
13.00	**Session plénière 2.** Compte-rendu
14.00	Session 3 du Groupe de travail. Allergénicité potentielle
15.30	*Pause café*
16.00	**Session plénière 3.** Compte-rendu
17.30	Synthèse et conclusions du Jour 2

Module 1 / diapositive 10

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Programme: Jour 3

9.00	**Session 4 du Groupe de travail.** L'analyse de la composition
10.30	*Pause café*
11.00	**Session plénière 4.** Compte-rendu
12.30	*Déjeuner*
13.30	**Présentation 5.** Communication sur les risques
14.30	**Session 5 du Groupe de travail.** A l'aide des études de cas: • donner une définition stratégique de la communication sur les risques; • préparer un exposé des décisions à l'intention du grand public
15.30	*Pause café*
16.00	**Session plénière 5.** Compte-rendu
17.30	Évaluation de l'atelier, certificats, remarques de conclusion, clôture de l'atelier

Module 1 / diapositive 11

Supports visuels Module 2

Concepts et principes de l'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Module de présentation 1

Concepts et principes de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

---

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Objectifs de la présentation

- Présenter les définitions, concepts et principes actuellement appliqués en matière de sécurité sanitaire des aliments transgéniques
- Présenter les textes, directives et recommandations internationalement reconnus, nécessaires pour la procédure d'évaluation de la sécurité sanitaire

Module 2 / diapositive 2

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Définition: biotechnologie moderne

Application de:

- techniques de manipulation *in vitro* des acides nucléiques, y compris la recombinaison de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'introduction directe d'acides nucléiques dans des cellules ou organites

ou

- fusion cellulaire d'organismes n'appartenant pas à une même famille taxonomique, qui surmontent les barrières naturelles de la physiologie de la reproduction ou de la recombinaison et qui ne sont pas des techniques utilisées pour la reproduction et la sélection de type classique

(Protocole de Carthagène sur la biosécurité)

Module 2 / diapositive 3

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

La biotechnologie moderne

- Élargit le champ des modifications génétiques
- Ne doit pas déboucher sur la production d'aliments moins sûrs que ceux obtenus par des techniques conventionnelles (OCDE, 1993)

↓

- Il n'est pas nécessaire de fixer des normes de sécurité sanitaire nouvelles ou différentes
- Les principes déjà établis de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments continuent de s'appliquer

Module 2 / diapositive 4

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Efforts internationaux

- Efforts concertés déployés au niveau international
- Principales consultations internationales sur l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques:
  - FAO/OMS
  - IFBC
  - ILSI
  - OCDE
  - CAC
  - etc.

(*suite*)

Module 2 / diapositive 5

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Efforts internationaux *(fin)*

- Les critères adoptés dans les différents pays pour évaluer la sécurité sanitaire des aliments transgéniques sont généralement compatibles (Banque mondiale, 2003)
- Les pays règlementent les aliments transgéniques, par des approches différentes, pouvant reposer sur la loi ou non

Module 2 / diapositive 6

Supports visuels Module 2 (suite)

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Considérations clés

- Des discussions internationales entre les pays de l'OCDE et des consultations d'experts FAO/OMS des Nations Unies ont abouti à un consensus sur les questions spécifiques de sécurité sanitaire à prendre en compte pour évaluer un aliment nouveau.

Module 2 / diapositive 7

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Principios generales

- Les principes ci-après sont utilisés au niveau international pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés d'organismes à ADN recombiné:
  - les aliments traditionnels sont généralement considérés comme sûrs, s'ils ont été préparés et manipulés comme il convient
  - les aliments nouveaux, y compris ceux à ADN recombiné, doivent obligatoirement faire l'objet d'une évaluation de leur sécurité sanitaire avant d'être mis sur le marché, dans certaines juridictions (telles que Japon, Canada, Australie et Nouvelle-Zélande, RU, UE)
  - une approche prudente est de rigueur pour les aliments, tels que les aliments à ADN recombiné, dont la consommation sûre n'est pas prouvée

(*suite*)

Module 2 / diapositive 8

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

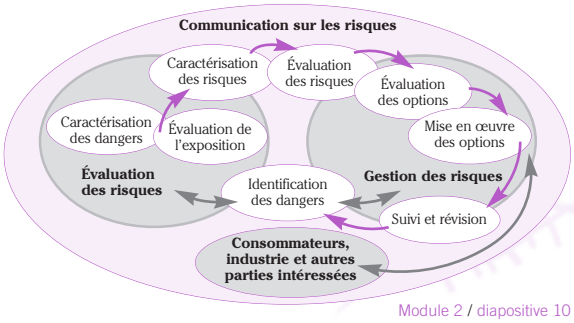
Principios generales *(fin)*

- Les évaluations de la sécurité sanitaire des aliments à ADN recombiné sont effectuées dans le respect de quelques principes clés:
  1. les évaluations de la sécurité sanitaire font appel à des méthodes scientifiques fondées sur les risques.
  2. les évaluations de la sécurité sanitaire se font «au cas par cas»
  3. Les effets recherchés et les effets non intentionnels des modifications génétiques sont pris en compte
  4. Le cas échéant, on procède à des comparaisons avec des aliments obtenus par des méthodes conventionnelles
- Les décisions eu égard à la sécurité sanitaire se fondent sur l'ensemble des preuves

Module 2 / diapositive 9

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

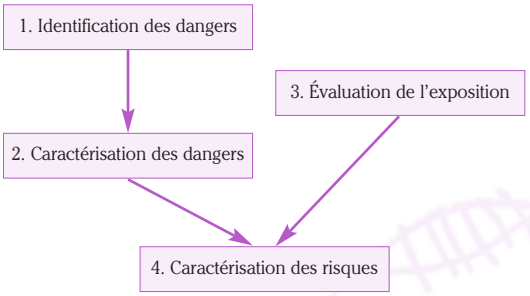
Cadre de l'analyse des risques



Module 2 / diapositive 10

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Évaluation des risques



Module 2 / diapositive 11

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

1. Les évaluations de la sécurité sanitaire font appel à des méthodes scientifiques fondées sur les risques

- L'**évaluation des risques** est le processus consistant à déterminer de façon aussi précise que possible la probabilité effective et les conséquences des risques découlant d'une exposition à des dangers identifiés
- L'objectif est d'**identifier les effets néfastes potentiels** des aliments à ADN recombiné pour la santé humaine
- Utiliser un **système d'identification des dangers** modifié, appelé évaluation de la sécurité sanitaire, pour déterminer si un danger est présent dans l'aliment entier

Module 2 / diapositive 12

Supports visuels Module 2 (suite)

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

2. Évaluations de la sécurité sanitaire «au cas par cas»

- S'appliquent à un produit alimentaire de base modifié, et aux aliments et à leurs produits dérivés qui en sont issus, par exemple le maïs (grains, farine de maïs, sirop de maïs, huile); canola (huile); coton (huile et linters)
- Les aliments dérivés d'un produit de base (e: soja) ayant subi des modifications intéressant différents caractères sont évalués séparément
- Tout produit auquel serait ultérieurement appliquée une biotechnologie moderne doit faire l'objet d'une évaluation de la sécurité sanitaire séparée

Module 2 / diapositive 13

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

3. Étude des effets souhaités et des effets involontaires

Les considérations de sécurité sanitaire s'appliquent à tous les aspects de l'aliment à ADN recombiné.
L'étude se fait en deux phases:

1. Identification des similitudes et des différences

- Comparaison entre les sources traditionnelles et nouvelles de gènes/ADN de l'organisme donneur
- Caractérisation moléculaire – nouveaux gènes, protéines, stabilité génétique
- Analyse de la composition

(*suite*)

Module 2 / diapositive 14

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

3.Étude des effets souhaités et des effets involontaires *(fin)*

2. Les différences identifiées sont ensuite passées au crible

- Toxicité, allergénicité des nouvelles protéines
- Sécurité des éventuels gènes de résistance aux antibiotiques transférés
- Sécurité, impact nutritionnel et changements éventuels de la composition

Module 2 / diapositive 15

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

4. Des comparaisons sont faites avec des aliments produits par des méthodes conventionnelles

- La variété d'aliment à ADN recombiné est comparée avec l'aliment traditionnel de référence, ayant un historique d'utilisation sans risque
- Cette comparaison sert à déceler des différences dans les concentrations d'allergènes, de toxines, de nutriments et de facteurs anti-nutritionnels survenant naturellement, ou dans la capacité à favoriser une croissance normale ou de bonnes conditions de vie
- Les différences significatives (entre l'aliment à ADN recombiné et l'aliment traditionnel) sont évaluées pour déterminer leur signification biologique et leurs effets néfastes potentiels sur la santé

Module 2 / diapositive 16

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Considérations de sécurité sanitaire

1. Description de l'organisme hôte modifié, y compris données sur la composition de l'élément nutritif, les facteurs antinutritionnels connus, les substances toxiques et le potentiel allergène et tout changement significatif de ceux-ci pouvant résulter d'une transformation normale.
2. Description de l'organisme donneur, y compris toutes les toxicités et allergénicités connues, ainsi que du ou des gène(s) introduit(s).
3. Caractérisation moléculaire de la modification génétique, y compris une description du processus de modification et la stabilité du caractère introduit.

(*suite*)

Module 2 / diapositive 17

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Considérations de sécurité sanitaire *(suite)*

4. Identification des produits géniques, y compris une description des caractéristiques du gène inséré.
5. Évaluation de l'innocuité des substances nouvelles prévues dans l'aliment, y compris une évaluation de toutes les toxines produites directement par la modification.
6. Évaluation du potentiel allergène de l'aliment nouveau

(*suite*)

Module 2 / diapositive 18

Supports visuels Module 2 (suite)

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Considérations de sécurité sanitaire *(fin)*

7. Évaluation des effets non désirés sur la composition alimentaire, y compris:
   a) évaluation des changements de la concentration des éléments nutritifs ou des substances toxiques rencontrées naturellement
   b) identification des composés antinutritionnels altérés de façon importante dans les aliments nouveaux
   c) évaluation de l'innocuité des composés dont la concentration est fortement modifiée

Module 2 / diapositive 19

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Principales initiatives: identifier et traiter les besoins futurs

Groupe d'étude de l'OCDE sur la sécurité des nouveaux aliments destinés à la consommation humaine et animale

- documents de consensus donnant des orientations sur les paramètres critiques (par exemple, les éléments nutritifs clés) de l'innocuité et de la qualité nutritionnelle de chaque culture vivrière
- documents concernant les produits déjà approuvés, ainsi que les produits qui devraient l'être à l'avenir
- http://www.oecd.org/document/63/0,2340,en_2649_34391_1905919_1_1_1_1,00.html

(suite)

Module 2 / diapositive 20

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Principales initiatives: identifier et traiter les besoins futurs *(fin)*

Groupe intergouvernemental spécial du Codex sur les aliments dérivés des biotechnologies

- Principes généraux pour l'analyse des risques liés aux aliments dérivés de plantes à ADN recombiné
- Directive régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes et de micro-organismes à ADN recombiné
- Etc…
- http://www.fao.org/ag/agn/agns/biotechnology_codex_fr.asp

Module 2 / diapositive 21

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Directive du Codex

Directive du Codex relative aux aliments dérivés de plantes à ADN recombiné

- L'évaluation de la sécurité sanitaire d'un aliment dérivé d'une plante à ADN recombiné suit un processus par étapes au cours duquel sont examinés les facteurs pertinents suivants:
  - description de la plante à ADN recombiné
  - description de la plante-hôte et de son utilisation comme aliment
  - description du ou des organisme(s) donneur(s)
  - description de la ou des modification(s) génétique(s)
  - caractérisation de la ou des modification(s) génétique(s)

(suite)

Module 2 / diapositive 22

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Directive du Codex *(fin)*

- Évaluation de la sécurité sanitaire
  - substances exprimées (substances autres que l'acide nucléique): évaluation de l'éventuelle toxicité et de l'allergénicité potentielle (protéines)
  - analyses de la composition en constituants essentiels
  - évaluation des métabolites
  - procédés de transformation de l'aliment
  - modifications nutritionnelles
  - autres considérations (gènes marqueurs)

Module 2 / diapositive 23

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Principales initiatives: identifier et traiter les besoins futurs

Consultations d'experts FAO/OMS

- Aspects de la sécurité sanitaire des aliments génétiquement modifiés d'origine végétale (juin 2000)
- Évaluation de l'allergénicité des aliments génétiquement modifiés (janvier 2001)
- Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments issus de micro-organismes génétiquement modifiés (septembre 2001)
- Sécurité sanitaire des aliments issus d'animaux génétiquement modifiés, y compris les poissons (novembre 2003)

(suite)

Module 2 / diapositive 24

Supports visuels Module 2 (fin)

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Principales initiatives: identifier et traiter les besoins futurs *(fin)*

- Sécurité sanitaire des aliments dérivés des biotechnologies
- Projet FAO de renforcement des capacités visant à aider les pays à mettre en ?uvre des normes internationales concernant l'analyse des risques liés aux produits dérivés des biotechnologies
- http://www.fao.org/ag/agn/agns/biotechnology_faowho_fr.asp

Module 2 / diapositive 25

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Conclusions

- Les concepts et principes définis par l'OCDE, la FAO/OMS et le Codex ont été appliqués concrètement par les pays qui évaluent la sécurité sanitaire des aliments dérivés des biotechnologies modernes
- Les évaluations conduites au niveau international des produits dérivés de plantes à ADN recombiné ont démontré que les concepts peuvent être appliqués de façon efficace lors de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés des biotechnologies modernes et de leur approbation

(*suite*)

Module 2 / diapositive 26

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Conclusions *(fin)*

- L'approche de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés des biotechnologies modernes est constamment évaluée, affinée et développée dans des instances internationales
- Les pays participants contribuent au processus et adoptent des approches «à jour» dans leurs propres systèmes de réglementation.

Module 2 / diapositive 28

Supports visuels Module 3

L'approche et le cadre de l'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Module de présentation 3

L'approche et le cadre de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

Objectif de la présentation

- Présenter le concept d'«approche comparative» et les raisons justifiant son adoption pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments génétiquement modifiés
- Présenter le concept de l'«équivalence en substance», ou «équivalence substantielle» (ES), des exemples de tests basés sur ce concept, les problèmes liés à l'application du concept ES, et des informations de base relatives à l'adaptation du concept
- Présenter le cadre du Codex
- Expliquer l'approche par étapes et les données spécifiques requises

L'approche comparative

- **Principe de base:** les produits peuvent être comparés avec des aliments traditionnels
- **Objectif:** déterminer si l'aliment génétiquement modifié présente des dangers nouveaux ou accrus par rapport à l'aliment traditionnel de référence
- **But:** Il ne s'agit pas d'établir un niveau de sécurité absolu, mais relatif, de sorte que le nouveau produit offre une certitude raisonnable qu'aucun dommage ne résultera des utilisations prévues

Les axes de l'approche

- Une évaluation de la sécurité sanitaire se fonde sur une comparaison entre un organisme à ADN recombiné et le produit traditionnel de référence, ou un contrôle par rapport à un «historique d'utilisation sans risque»
- La comparaison est axée sur la détermination des similitudes et des différences

Concept clé

- Si un danger, nutritionnel ou un autre problème de sécurité sanitaire, nouveau ou modifié (notons que tous les dangers ne sont pas nouveaux, bon nombre d'entre eux étant présents dans l'aliment existant) était identifié, le risque devrait être caractérisé pour déterminer sa pertinence pour la santé humaine et animales

«Familiarité» et détermination

- La **familiarité** s'entend de la connaissance des caractéristiques d'une espèce et de l'expérience de son utilisation
- La **détermination** se fonde sur la documentation scientifique et l'expérience pratique de l'organisme et des variétés ou lignées similaires

Supports visuels Module 3 (suite)

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Identification des effets involontaires

- Les nouveaux produits à profil nutritionnel volontairement modifié vont nous permettre de tester notre capacité à évaluer les conséquences non intentionnelles.
- Exemples:
  - riz génétiquement modifié à faible teneur en gluteline (la diminution du taux de gluteline a été associée à une augmentation non intentionnelle des taux de prolamine)
  - le «riz doré» génétiquement modifié (conçu pour exprimer des taux accrus de bêta-carotène, mais de façon inattendue, on a constaté que cette modification s'accompagnait de taux plus élevés de xanthophylle)

Module 3 / diapositive 7

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Équivalence en substance

- A été décrite pour la première fois dans une publication de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) en 1993
- 60 experts de 19 pays ont étudié pendant plus de deux ans la manière d'évaluer la sécurité des aliments génétiquement modifiés
- Le concept d'équivalence en substance a par la suite été approuvé par une consultation mixte d'experts FAO/OMS en 1996
- Le concept de familiarité a été le précurseur du concept de l'équivalence en substance, une approche développée par certaines juridictions dans le cadre du processus d'évaluation des risques

Module 3 / diapositive 8

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Concept clé

- L'équivalence en substance est l'un des nombreux outils utilisés dans le cadre du processus de réglementation pour prendre des décisions sur des caractéristiques déterminées d'un organisme à ADN recombiné, par rapport à son homologue traditionnel (organisme apparenté, hôte ou donneur)
- Le concept devrait être considéré comme un point de départ pour déterminer la sécurité sanitaire des différences décelées lors de l'analyse complète d'un organisme à ADN recombiné, plutôt que comme une étape pour la décision finale

Module 3 / diapositive 9

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Un sujet de discussion

La question de l'utilisation appropriée du concept de l'équivalence en substance a été longuement débattue par de nombreux organes d'experts

- OCDE/ FAO/OMS, Codex
- Institute of food technology, 2000
- NZ Royal Commission on Genetic Modification, 2001

(*suite*)

Module 3 / diapositive 10

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Un sujet de discussion *(fin)*

- Rapport de la Société royale du Canada, 2001
- Académie nationale des sciences (NAS – États-Unis)
- UK Royal Society, 2002
- Society of Toxicology Position Paper, 2002
- American College of Nutrition, 2002
- UK Government Report, 2003

Module 3 / diapositive 11

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Adoption du concept

- L'**OCDE** et quelques d'autres organisations internationales reconnaissent la validité de ce concept qui «contribue à l'établissement d'une base solide d'évaluation de la sécurité sanitaire»
- Le **Groupe spécial du Codex** continue à travailler sur le concept de l'équivalence substantielle dans les évaluations de la sécurité sanitaire et de la nutrition et sur d'éventuelles stratégies de substitution
- La **Directive du Codex** contient une référence à l'équivalence substantielle (paragraphe 13), comme «une étape clé dans le processus d'évaluation de la sécurité sanitaire, qui n'est pas en soi une évaluation de sécurité sanitaire»

Module 3 / diapositive 12

Supports visuels Module 3 (fin)

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Limites de l'équivalence en substance

- Elle nécessite des données analytiques suffisantes, publiées ou tirées des analyses
- Elle dépend d'un comparateur et des éléments d'information disponibles ou pouvant être produits pour le comparateur
- Le choix du comparateur est crucial pour garantir une application efficace du concept d'équivalence en substance
- Un comparateur approprié doit avoir des antécédents d'utilisation bien documentés

Module 3 / diapositive 13

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Remarques concernant l'approche comparative

- Différences entre l'**aliment entier** et les **substances individuelles** (additifs, pesticides, etc.)
  - Les évaluations de la sécurité sanitaire requièrent des approches différentes
  - Les aliments entiers issus de nombreuses plantes cultivées contiennent parfois des substances toxiques naturelles, des anti-nutriments – qui peuvent être importants pour la plante mais nocifs pour l'homme
- La **Directive du Codex** recommande le recours à une **évaluation comparative** pour déterminer la sécurité sanitaire des aliments génétiquement modifiés (aussi sûrs que l'aliment traditionnel de référence)
  - Paragraphes 13 à 17.

Module 3 / diapositive 14

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Cadre du Codex

- «Principes pour l'analyse des risques liés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes» (2003)
- «Directives régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné» (2003)

Module 3 / diapositive 15

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Approche par étapes

- Directive **paragraphes 18 à 21**
- **But:** examiner les conséquences recherchées et involontaires de la modification spécifique sur les constituants de l'aliment, par rapport à un aliment traditionnel de référence ayant un historique d'utilisation sans risque

Module 3 / diapositive 16

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Données spécifiques requises

- Description de la plante à ADN recombiné (paragraphe 22)
- Description de la plante hôte et de son utilisation comme aliment (paragraphes 23 à 25)
- Description du ou des organisme(s) donneur(s) (paragraphe 26)
- Description de la ou des modification(s) génétique(s) (paragraphe 27 à 29)

Module 3 / diapositive 17

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Tâches du Groupe de travail

- A l'aide des études de cas, identifier:
  - la description de la plante à ADN recombiné
  - la description de la plante-hôte et de son utilisation comme aliment
  - la description du ou des organisme(s) donneur(s)
  - la description de la (des) modification(s) génétique(s)
- Puis, déterminer si les informations concernant les points ci-dessus sont suffisamment détaillées

Module 3 / diapositive 18

Supports visuels Module 4

Caractérisation de la ou des modification(s) génétique(s), évaluation de la toxicité et de l'allergénicité potentielles et analyse de la composition

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Module de présentation 4

Caractérisation de la ou des modification(s) génétique(s), évaluation de la toxicité et de l'allergénicité potentielles et analyse de la composition

Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Objectifs de la présentation

- Expliquer la méthodologie de caractérisation de la ou des modification(s) génétique(s)
- Présenter la méthodologie d'évaluation de la toxicité, y compris des études sur animaux
- Présenter la méthodologie d'évaluation de l'allergénicité potentielle, y compris les paramètres importants
- Présenter les méthodologies d'analyse de la composition, d'évaluation des métabolites, des procédés de transformation des aliments et des modifications nutritionnelles

Module 4 / diapositive 2

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

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

- Directive du Codex paragraphes 30 à 33
  - Analyse moléculaire
  - Événements de transformation de la plante générés de façon aléatoire
  - Détection de transgènes au moyen d'amorces spécifiques d'un évènement
  - Degré de perfectionnement, compte tenu du niveau actuel des technologies

Module 4 / diapositive 3

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Toxicité

- Directive du Codex, paragraphes 34 à 40
- Principales considérations:
  - Produit (s) d'expression des protéines du ou des gène(s) inséré(s)
  - Effets résultant d'une perturbation de l'expression des gènes due à l'insertion de l'ADN du donneur dans le génome hôte
- Objet de la détermination de la sécurité sanitaire: aliment aussi sûr que l'aliment traditionnel de référence
  - Par exemple, le soja traditionnel peut affecter les fonctions endocriniennes, donc le soja génétiquement modifié de composition équivalente le peut aussi.

Module 4 / diapositive 4

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Études *in vitro*

- Nouvelles protéines (par opposition aux autres substances chimiques)
  - Devenir métabolique prévisible dans le tube digestif de l'homme/animal
  - Test de digestibilité *in vitro* – indique la probabilité qu'une protéine ait des caractéristiques inhabituelles pour les protéines alimentaires
- Si une protéine s'avère résistante aux fluides digestifs normaux: significatif pour les protéines ayant des activités biologiques potentiellement néfastes (toxicité ou allergénicité)
- Les protéines qui ont un effet toxique l'exercent généralement rapidement – les tests de toxicité aiguë sont considérés comme adéquats

Module 4 / diapositive 5

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Études sur animaux

- Principal élément de l'évaluation de la sécurité sanitaire de nombreux composés: pesticides, médicaments, produits chimiques, additifs alimentaires, etc.
- Substance: pureté connue, sans valeur nutritionnelle
- Directive du Codex paragraphes 10–12 et 53
- Difficultés: les aliments sont des mélanges complexes de composés souvent caractérisés par une grande variation de leur composition et valeur nutritionnelle – il est extrêmement difficile de détecter les effets néfastes éventuels dans des études sur animaux sans traitements de contrôle appropriés

Module 4 / diapositive 6

Supports visuels **Module 4 (suite)**

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Allergénicité (protéines)

- Directive du Codex paragraphes 41 à 43
- Les véritables allergies alimentaires peuvent mettre en jeu plusieurs types de réponses immunitaires
- Types les plus courants: induits par des anticorps qui sont des immunoglobulines de la classe E (IgE) spécifiques d'un allergène
- Les véritables allergies alimentaires peuvent aussi englober des réactions à médiation cellulaire

(*suite*)

Module 4 / diapositive 7

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Allergénicité (protéines) *(fin)*

- Le Codex a établi une liste des aliments allergisants les plus courants associés à des réactions induites par l'IgE
- Les cultures alimentaires génétiquement modifiées destinées à la consommation humaine peuvent avoir un pouvoir allergisant
- Le Codex recommande d'utiliser une approche au cas par cas, progressive et intégrée pour l'évaluation de l'allergénicité potentielle des aliments génétiquement modifiés

Module 4 / diapositive 8

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Stratégie d'évaluation

- Première étape –détermination de
  - l'origine de la protéine introduite
  - toute similarité significative entre la séquence d'acides aminés de la protéine et celle des allergènes connus
  - ses propriétés structurelles
- Aucun test unique ne peut prédire la probabilité d'une réponse IgE humaine suite à une exposition par voie orale
- Purification des nouvelles protéines exprimées chez la plante à ADN recombiné, pour caractériser la protéine
- Il est important d'établir si la source est connue pour provoquer des réactions allergiques

Module 4 / diapositive 9

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Paramètres importants

- Origine de la protéine
- Homologie de la séquence d'acides aminés
- Résistance à la pepsine
- Dépistage de sérums spécifiques

Module 4 / diapositive 10

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Remarques sur l'évaluation de la toxicité et de l'allergénicité

- **Assurance de la qualité**
  - Il est essentiel que le processus d'organisation et les conditions de planification, d'exécution, de contrôle, d'enregistrement et de notification des examens de laboratoire soient conformes aux principes des Bonnes pratiques de laboratoire
  - Études toxicologiques: il est important d'établir la relation entre les variations des paramètres physiologiques mesurés et les doses administrées du composé testé

(*suite*)

Module 4 / diapositive 11

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Remarques sur l'évaluation de la toxicité et de l'allergénicité *(fin)*

- **Autres méthodes et outils**
  - Comme les connaissances scientifiques et les technologies évoluent, d'autres méthodes et outils peuvent être envisagés pour évaluer l'allergénicité potentielle des protéines nouvellement exprimées

Module 4 / diapositive 12

Supports visuels Module 4 (fin)

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Analyse de la composition

- Éléments bénéfiques et nocifs du régime alimentaire:
  - eléments nutritifs
  - substances bioactives sans valeur nutritive
  - facteurs antinutritionnels
  - substances toxiques
  - contaminants
  - autres éléments potentiellement utiles et dangereux
- It est important de déterminer les éléments nutritifs/éléments sur lesquels doit être centrée l'évaluation
- Directive du Codex, paragraphes 44 à 46

Module 4 / diapositive 13

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Procédés de transformation des aliments

- Directive du Codex paragraphe 47
- Les méthodes de transformation peuvent entraîner des variations significatives de la teneur en éléments nutritifs d'un produit alimentaire
- Les techniques de séparation modernes (mouture, centrifugation, pressage, etc.) altèrent le contenu nutritionnel
- Les techniques de chauffage peuvent réduire la teneur en nombreux éléments nutritifs thermolabiles (vitamines, substances phytochimiques, etc.)

Module 4 / diapositive 14

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Modifications nutritionnelles

- Directive du Codex, paragraphes 48 à 53
- Pour les plantes à ADN recombiné, dont les éléments nutritifs ont été altérés de propos délibéré, le but de l'évaluation nutritionnelle est de démontrer l'absence de modifications non intentionnelles (biodisponibilité, etc.)
- Les différences de composition sont généralement plus importantes – les méthodes d'évaluation de la sécurité sanitaire actuelles peuvent donc apparaître insuffisantes, du fait que les cultures dont le contenu nutritionnel a été modifié ne seront pas «équivalentes en substance» par rapport à l'aliment traditionnel de référence, et auront moins de valeurs compositionnelles en commun à comparer

Module 4 / diapositive 15

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Nouvelles méthodes analytiques

- Des méthodologies plus perfectionnées et des techniques plus sensibles permettent de détecter des altérations non recherchées de la composition jusque là impossibles à déceler
- L'utilité et l'applicabilité des techniques d'évaluation des risques non ciblées doivent faire l'objet d'un examen plus approfondi pour déterminer si les modifications observées ont une incidence sur la sécurité sanitaire
- Les méthodes d'établissement de profils ne sont pas encore utilisables aux fins de l'évaluation des risques, mais si elles sont validées, elles peuvent être utiles pour confirmer et compléter d'autres données

Module 4 / diapositive 16

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Tâches du groupe de travail

En s'appuyant sur les études de cas:

- **identifier** les études de la toxicité et **évaluer** la toxicité potentielle
- **identifier** les études de l'allergénicité, puis **évaluer** l'allergénicité potentielle
- **identifier** la description de l'analyse de la composition, puis **évaluer** l'analyse

Module 4 / diapositive 17

Supports visuels Module 5

Communication sur les risques et décisions en matière de sécurité sanitaire

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Module de présentation 5

Communication sur les risques et décisions en matière de sécurité sanitaire

Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

---

Objectifs de la présentation

- Présenter la communication sur les risques dans le contexte de l'analyse des risques (Codex)
- Expliquer ce que la communication sur les risques devrait et ne devrait pas être
- Expliquer les processus de perception des risques et de confiance
- Présenter une stratégie de communication liée à la sécurité sanitaire des aliments
- Présenter les recommandations de la consultation d'experts FAO/OMS

La communication sur les risque dans le contexte de l'analyse des risques

- Principes de travail pour l'analyse des risques, destinés à être appliqués dans le cadre du Codex alimentarius (2003): orientations générales sur l'analyse des risques
- Communication liée au processus d'analyse des risques
- Partie intégrante de l'évaluation des risques et de la gestion des risques
- Opérationnelle dès le début du processus d'analyse des risques, et non pas ajoutée à la fin
- Responsabilité partagée

Principes de travail: aspects généraux

- **Le processus d'analyse des risques doit être:**
  - appliqué de manière cohérente
  - ouvert, transparent et documenté
  - les trois volets de l'analyse des risques doivent être complètement et systématiquement documentés de manière transparente
  - une communication et une consultation effectives avec toutes les parties intéressées doivent être assurées tout au long de l'analyse des risques
- **Démarche structurée comprenant:**
  - trois volets - évaluation des risques, gestion des risques et communication sur les risques - chacun de ces volets faisant partie intégrante de l'ensemble du processus et étant mis en œuvre dans un cadre global

---

Définition du Codex de la communication sur les risques

- Échange interactif, tout au long du processus d'analyse des risques, d'informations et d'opinions sur les risques, les facteurs liés aux risques et les perceptions des risques, entre les responsables de leur évaluation et de leur gestion, les consommateurs, l'industrie, les milieux universitaires et les autres parties intéressées, et notamment l'explication des résultats de l'évaluation des risques et des fondements des décisions prises en matière de gestion des risques.

La communication sur les risques doit:

- promouvoir la prise de conscience et la compréhension des enjeux spécifiques pris en compte;
- promouvoir la cohérence et la transparence dans la formulation des options et recommandations de gestion des risques;
- fournir une base solide pour la compréhension des décisions de gestion des risques proposées;
- améliorer l'efficacité et l'efficience globales de l'analyse des risques;

(*suite*)

Supports visuels Module 5 (suite)

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

La communication sur les risques doit *(fin)*:

- renforcer les relations de travail entre les participants;
- favoriser la compréhension du public afin de renforcer la confiance dans la sécurité de l'offre alimentaire;
- promouvoir l'implication appropriée de toutes les parties intéressées et
- échanger des informations relatives aux préoccupations des parties intéressées sur les risques associés aux aliments.

Module 5 / diapositive 7

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

La communication des risques implique…

- un processus à double sens
- de comprendre comment les gens perçoivent les risques
- une opportunité d'associer le public à la prise de décision
- la fourniture d'information exactes, en temps voulu
- une communication interne

Module 5 / diapositive 8

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

La communication sur les risques n'est pas…

- uniquement faite pour communiquer les risques
- uniquement faite pour vendre des décisions au public
- un processus lié à une crise
- une question qui relève uniquement de la responsabilité de spécialistes en communication

Module 5 / diapositive 9

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Principale fonction de la communication sur les risques

- Assurer que toutes les informations et les opinions requises pour une gestion efficace des risques soient prises en compte dans le processus de prise de décision
- Expliquer de façon transparente:
  - la politique d'évaluation des risques
  - l'évaluation des risques
  - les incertitudes

Module 5 / diapositive 10

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

En tant qu'élément important de la procédure de prévention des risques biotechnologiques

Faire en sorte que le public accepte l'aliment dérivé de plantes à ADN recombiné

- communiquer et interagir avec le public à propos des risques spécifiques et des mesures prises
- un mécanisme qui instaure la confiance entre les parties prenantes de façon progressive tout au long des différentes phases de la mise au point de la plante à ADN recombiné et des aliments qui en sont dérivés

Module 5 / diapositive 11

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Deux composantes de la communication sur les risques

- **Composantes techniques**, concernant généralement les dangers scientifiques évalués au cours de **l'évaluation des risques** et les **options de gestion** mises en évidence par l'évaluation
- **Composantes non techniques**, comprenant les protocoles **administratifs**, ainsi que les aspects culturels et éthiques de la société traités par les institutions règlementaires durant le processus d'analyse des risques

Module 5 / diapositive 12

Supports visuels Module 5 (suite)

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Communication règlementaire des risques

- Principes du Codex, paragraphes 22 à 24
  - expliquer comment et pourquoi les décisions sont prises
  - tenir compte des préoccupations exprimées par les parties prenantes
  - expliquer comment ces problèmes ont été traités
- Un certain nombre de pays ont adopté les mesures de l'OCDE relatives à la diffusion des informations
  - inviter le public à faire des observations sur les rapports d'évaluation de la sécurité sanitaire
  - divulguer les informations utilisées dans les évaluations de la sécurité sanitaires
  - publier les résultats des réunions des organismes responsables de l'évaluation de la sécurité sanitaire

Module 5 / diapositive 13

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

La communication sur les risques, un processus à double sens

- Communication règlementaire sur les risques
  - fournir des informations sur le cadre et les processus règlementaires
  - collecte d'informations et informations en retour
- La crédibilité est garantie dans le processus de communication, grâce à des études techniques, présentées sous une forme aisément compréhensible
- Deux questions – soulevant le problème du choix et de la connaissance des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné pouvant être mis sur le marché – méritent une réponse:
  - les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné sont-ils sans danger?
  - ouels sont les aliments génétiquement modifiés?

Module 5 / diapositive 14

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

La perception des risques

- Nous voyons tous le monde différemment (état d'esprit)
- Les gens qui viennent d'horizons similaires tendent à avoir la même perception des risques
- Quelques différences selon le sexe
- Les personnes qui maîtrisent moins bien leur existence tendent à «grandir les risques»
- La perception des risques fondée sur des preuves:

RISQUE = DANGER

- La perception des risques par le consommateur:

RISQUE = DANGER + INDIGNATION

Module 5 / diapositive 15

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Perception du degré de risque par les consommateurs

- Les matériels d'information ciblés sont souvent alarmistes
- Les parties intéressées se préoccupent de l'équilibre entre les messages sanitaires et les risques potentiels
- S'applique à de nombreux contaminants de produits alimentaires
- Le niveau de risque acceptable varie en fonction des pays et des communautés

Module 5 / diapositive 16

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Confiance

- Confiance du public dans l'innocuité des approvisionnements alimentaires
- Confiance dans l'industrie et les organes de réglementation pour garantir l'innocuité des aliments
- Difficile de regagner la confiance quand elle est perdue
- Pas de situation «à armes égales»
- Les événements négatifs se remarquent plus que les événements positifs
- Les sources de mauvaises nouvelles sont considérées comme plus crédibles
- Les médias sont attirés par les mauvaises nouvelles
- Les groupes d'intérêt se servent habilement des médias

Module 5 / diapositive 17

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Diffuser l'information

- La diffusion rapide est indispensable
  - les «fuites» sont inévitables – perte de confiance/crédibilité
  - les gens ont le droit d'être informés sur ce qui a une incidence sur leur vie
  - la rapidité de la résolution des problèmes en dépend
  - Elle permet de mieux contrôler l'exactitude de l'information
  - diffuser l'information demande moins de travail que de répondre aux questions
  - les probabilités de susciter la colère du public sont moindres
  - les probabilités que le public grandisse les risques sont moindres
  - on dispose de plus de temps pour associer le public

(Extrait d'un document du New Jersey Department of Environmental Protection, 1987)

Module 5 / diapositive 18

Supports visuels Module 5 (fin)

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Stratégie de communication

Risque	*Risque perçu*	*Exemples*	*Stratégie*
Faible	Faible	Niveaux de contaminants autorisés	Passive
Faible	Élevé	**Aliments génétiquement modifiés**, dioxines, mercure dans le poisson	Réactive
Élevé	Faible	Contamination microbienne	Éducative
Élevé	Élevé	ESB	Proactive

(*suite*)

Module 5 / diapositive 19

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Stratégie de communication *(fin)*

- Identifier les publics – fractionner les groupes de parties prenantes (ne pas oublier les publics internes)
- Préparer les messages – normalement trois messages clés et séparer les messages destinés à chaque type de public
- Sélectionner les instruments de communication

Module 5 / diapositive 20

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Médias

- Presse, radio et télévision
- Établir des relations de travail et la crédibilité dans les périodes calmes
- Savoir quels messages vous souhaitez transmettre
- Etre ouvert et honnête… et disponible
- Etre «serviable»
- Comprendre comment les médias travaillent

Module 5 / diapositive 21

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

FAO/OMS: Considérations utiles pour la communication sur les risques

- Connaître le public
- Faire intervenir des experts scientifiques
- Établir l'expertise en matière de communication
- Être une source d'information crédible
- Partager les responsabilités
- Faire la distinction entre opinion scientifique et jugement de valeur
- Garantir la transparence

Module 5 / diapositive 22

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Communication des risques liés à une évaluation de la sécurité sanitaire

- Production de meilleures informations sur le système de réglementation
- Création d'un organe d'information centralisé
- Accroître la sensibilisation et l'engagement du public

Module 5 / diapositive 23

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments transgéniques

Tâches du Groupe de travail

À l'aide des études de cas:

- **définir une stratégie** pour les méthodes de communication sur les risques
  - associer toutes les parties prenantes?
  - avoir de bonnes relations avec les médias?
  - construire la crédibilité?
- **préparer un exposé** des décisions à l'intention du grand public

Module 5 / diapositive 24

Partie 3
Études de cas
(en anglais)

Pour renforcer l'utilité des études de cas en tant qu'outils de formation, certains éléments d'information ont été résumés et les données présentées dans les études de cas ne sont qu'un sous-ensemble de celles qui ont été effectivement déposées. Les études de cas ne constituent en aucune manière une demande complète, ni même une évaluation complète de la sécurité.
Elles ont été incorporées telles quelles dans ce programme de formation (notamment avec les fautes et les incohérences de langage qui y figuraient initialement) sans aucune amélioration de la FAO. Les points de vue qui y sont exprimés ne reflètent pas nécessairement ceux de la FAO.

Etude de cas 1
121 Evaluation de la sécurité sanitaire du maïs génétiquement modifié résistant aux insectes - Evènement de transformation MON 810
Food safety assessment of genetically modified insect resistant corn event MON 810

Etude de cas 2
135 Evaluation de la sécurité sanitaire du soja génétiquement modifié à haute teneur en acide oléique
Safety assessment of genetically modified high oleic acid soybeans

Etude de cas 3
165 Evaluation de la sécurité sanitaire du soja génétiquement modifié résistant aux herbicides
Food safety assessment of a genetically modified herbicide tolerant soybean

Etude de cas 1

Evaluation de la sécurité sanitaire du maïs génétiquement modifié résistant aux insectes - Evènement de transformation MON 810

Food safety assessment of genetically modified insect resistant corn event MON 810

122 Description of the Recombinant-DNA Plant
122 Description of the Host Plant and its Use as Food
123 Description of the Donor Organism(s)
123 Description of the Genetic Modification
125 Characterization of the Genetic Modification
125 Introduction
125 Molecular Characterization
127 Modified Plant Expression
127 The *cry1a(b)* Gene and Its Novel Trait
127 Equivalence of Bacterial and Plant Produced Protein
128 Expression
129 Breakdown Products and Metabolism
129 Stability of the Insert
129 Assessment of Possible Toxicity
129 Introduction
130 Protein Specificity
130 Comparison to Toxin Databases
130 Mouse Acute Oral Gavage
130 Potential Toxic Contaminants
131 Metabolic Degradation in Simulated Gastric and Intestinal Fluids
131 Assessment of Possible Allergenicity
132 Compositional Analyses of Key Components, Evaluation of Metabolites, Food Processing and Nutritional Modification
132 Introduction
132 Compositional Data

Preface

The United States Food and Drug Administration (FDA) completed a consultation for insect resistant (protected) corn line MON 810 in 1996. Health Canada notified Monsanto that the Department had no objection to the food use of corn line MON 810 in 1997. These decisions were made by both regulatory authorities following a comprehensive assessment of MON 810 based upon internationally accepted principles for establishing the safety of foods derived from genetically modified plants. The record of review and decision-making is described for the FDA consultation in Appendix 1 and for Health Canada's assessment in Appendix 2.

The data and information in this case study have been summarized for training purposes. The case study is derived from parts of the food safety submission assessed by Health Canada. Monsanto Canada Inc. provided data on the description of the new variety, the donor organism(s), the genetic modification methods and characterization. The novel protein was identified, characterized and compared to the original bacterial protein, including an evaluation of its potential toxicity. Scientific publications and data from field testing in Canada and the United States under confined trials in 1995 and 1996 were supplied.

Note that statements in quotes are taken directly from the submission to Health Canada.

Disclaimer

Monsanto Canada Inc. has consented to the use of the information provided in their regulatory submission for event MON 810 as a training tool. It must be noted, however, that in order to enhance the utility of the case study as a training tool, liberties were taken with the information provided in the original applications. Certain information has been reduced to summaries and the present data as presented in the case study are only a subset of that actually submitted. The case study in no way constitutes a complete application nor is it to be considered a complete safety assessment. To that end, the use of this information in the form of a training tool does not constitute an endorsement of the information or product nor should it be considered a reflection of any of the original submissions.

Description of the recombinant-DNA plant

Line MON 810 contains an inserted genetic fragment of the *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD-1 that produces an active delta endotoxin protein expressed in the corn tissue. The target pest, European corn borer (ECB) (*Ostrinia nubilalis*), is an important corn insect pest. Physical damage is caused by ECB feeding on various tissues of the corn plant. The tissues damaged depend on the number of generations of ECB. The damage from ECB feeding includes: a) leaf feeding, b) stalk tunneling, c) leaf sheath and collar feeding, and d) ear damage. Estimated losses range from 5-10% corn yield annually from ECB from disruption of nutrient and water translocation, secondary disease infections, stalk lodging, ear droppage and kernel damage.

The company further describes the variety and its history, "Line MON 810 was supplied to various seed companies as F1 seed of transformed genotype Hi-II crossed to several various elite inbreds. The resulting lines were subjected to multiple cycles of backcrossing to the recurrent inbred parent to recover the converted elite genotype, followed by several cycles of selfing to derive converted inbred parents for hybrid testing. Further cycles of seed increase (selfing) are required to produce parent seed for commercial hybrid seed production. Insect-protected hybrid seed will be heterozygous for the *cryIA(b)* gene since one inbred parent containing the gene is sufficient to confer the insect-protected phenotype on progeny hybrids."

MON 810 is a field corn, not a sweet corn and is intended primarily as an animal feed, but some human food uses occur for field corn. For example, MON 810 may be used either dry or wet milled in processed corn products for humans. No differences in the intended uses of MON 810 are expected as compared to existing field corn hybrids.

Description of the host plant and its use as food

The host plant used is a hybrid line of *Zea mays* with a Mo17X (Hill X B73) background. These corn lines have a long history of use in particular as animal feed, being field corn and not sweet corn.

Zea mays L. (corn, maize) has been cultivated for over 8000 years in Mexico and Central America. A versatile and responsive species, corn has increased both in productivity and geographical range over the past century

with the development of hybrids, breeding programs and fertilizer use and is now grown on every habitable continent. Corn yields prior to hybridization in the early 1930s were around 1.3 metric ton per hectare (ha). The current record high is 123.5 t/ha (with an average of around 137 bushels per acre in the US). World production of corn in 2000 is estimated at 23,800 million bushels.

Corn is used for many different products and uses, as a staple food in many parts of the world and in derived forms, such as starch, alcohol, oil, and for animal feed. Also, corn is used for production of ethanol as a renewable fuel.

Description of the donor organism(s)

The donor of the *cryIA(b)* gene that codes for the CryIA(b) protein, a delta endotoxin active against lepidopteran insect pests, is *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (B.t.k.) strain HD-1.

The cryIA(b) gene inserted into MON 810 originates from a *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Bacillus thuringiensis* (or Bt) species are spore-forming, gram-positive bacteria that produce a crystal with insecticidal properties. Bt species have been used commercially as pest control agents for decades.

Different strains of Bt are insecticidally active against selected insect pests:

- Bt *israelensis* strains for dipterans (mosquitoes and black flies)
- Bt var. *sandiego* and *tenebrionis* strains for coleopterans (Colorado potato beetle, elm leaf beetle, yellow mealworm)
- Bt *kurstaki*, *thuringiensis*, *sotto* and *aizawai* strains for lepidopterans (corn borer, tomato hornworms, gypsy moth, cabbage looper, tobacco budworm, cotton bollworm).

The delta endotoxin crystals are produced when the bacterium sporulates. To be active, the protein must be ingested by the insect. While the protein is insoluble at neutral or acidic pH, it is soluble at the alkaline pH that occurs in the guts of larval insects where it is activated by proteases in the gut. The activated protein (stripped of its carboxy terminal and about 28 amino acids from the amino terminal end, at approximately 600 amino acids in size) diffuses through the peritrophic membrane of the insect to the midgut epithelium. There it binds to the specific high affinity receptors on the surface of the insect midgut, inserts itself into the membrane and forms ion-specific pores (non-target insects, birds, mammals and fish do not have these receptors). The resulting pores in the membrane cause leakage of the intracellular contents into the gut lumen and water into the epithelial gut cells which swell and lyse. The gut becomes paralyzed disrupting the digestive process, which causes the insect to stop eating and die.

The protein produced in MON 810 insect protected (IP) corn is identical to that produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD-1, which controls insect pests by the production of delta-endotoxin crystals. Data to support this claim are supplied in the submission.

B.t.k. has been used as a microbial pest control agent for decades and "the naturally occurring Bt proteins have been demonstrated to be virtually non-toxic to fish, avian species, mammals and other nontargets … no adverse effects are expected to wildlife from the commercialization of these plants."

The company's submission states: "The CryIA(b) protein is insecticidal only to lepidopteran insects. Only seven of the eighteen insects screened were sensitive … and they were all lepidopteran. This specificity is directly attributable to the presence of receptors in the target insects. Selective activity of B.t.k. endotoxin will not disrupt populations of either beneficial insects or nontarget animals (*e.g.*, birds, fish)."

Tests (cited from the literature), registration documentation and safety assessments from pesticidal registrations on commercially available microbial pesticide products, such as DIPEL®, indicate that they are "widely recognized as nontoxic for mammals, birds and fish as well as beneficial nontarget insects including predators and parasitoids of lepidopteran insect pests and honeybee."

Description of the genetic modification

Plasmid DNA was introduced into the plant tissue by particle acceleration (also known as biolistic transformation). The DNA is precipitated onto the surface of microscopic tungsten or gold particles using calcium chloride and spermidine. A drop of coated particles, placed onto a plastic macrocarrier, is accelerated at high velocity through a barrel by a gunpowder explosion. The macrocarrier flight is stopped by a plastic stopping plate allowing the DNA-coated particles to continue their journey, penetrating plant cells in the path of the explosion. The DNA is deposited and incorporates into the cell chromosome. The cells are incubated on a tissue culture medium containing 2,4-D, which supports callus growth. The cells with introduced DNA contain genes for glyphosate tolerance and are

grown in the presence of glyphosate to select the transformed cells.

Two plasmids were used during this biolistic process, PV-ZMBK07 (Figure 1) containing the cryIA(b) gene and PV-ZMGT10 (Figure 2) containing two marker genes used for selection on glyphosate, CP4 EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) and glyphosate oxidoreductase (gox). Tables 1 and 2 describe the DNA elements in the plasmids.

Only a portion of the PV-ZMBK07 plasmid vector is present in MON 810 and the final MON 810 construct does not contain the marker genes. Details on how this was determined follow in Chapter 3. "It is presumed that the genes which allow for selection on glyphosate were originally incorporated into the plant genomic DNA but were lost by segregation during backcrossing." The reason given is that these genes "integrated at a separate loci from the cryIA(b) gene and segregated out during the crossing."

While both plasmids contain the nptII gene encoding for neomycin phosphotransferase II (*nptII*) under the control of its own bacterial promoter, data shows that the *nptII* gene is not present in MON 810. This bacterial gene was used as a selectable marker during plasmid construction.

Experiments in corn transformation have demonstrated that the frequency of obtaining transformants containing glyphosate tolerance selection

Table 1. Summary of DNA elements in plasmid PV-ZMBK07 (See Fig. 1)

Genetic element	*Size Kb*	*Function*
E35S	0.61	The cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter with the duplicated enhancer region
hsp 70 intron	0.80	Intron from the maize *hsp70* gene (heat shock protein) present to increase the level of gene transcription
cryIA(b)	3.46	The gene encodes the CryIA(b) protein product
NOS 3'	0.26	A 3' nontranslated region of the nopaline synthase gene which terminates transcription and directs polyadenylation
lacZ	0.24	A partial *E. coli lacI* coding sequence, the promoter P*lac* and a partial coding sequence for β-D-galactosidase or lacZ protein from pUC119
ori-pUC	0.65	The origin of replication for the pUC plasmids that allows for plasmid replication in *E. coli*
nptII	0.79	The gene for the enzyme neomycin phosphotransferase type II. This enzyme confers resistance to aminoglycoside antibiotics and thereby allows for selection of bacteria containing the plasmid

Table 2. Summary of DNA elements in plasmid PV-ZMGT10 (See Fig. 2)

Genetic element	*Size Kb*	*Function*
E35S	0.61	The cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter with the duplicated enhancer region
hsp 70 intron	0.80	Intron from the maize *hsp70* gene (heat shock protein) present to increase the level of gene transcription
CTP2	0.31	Chloroplast transit peptide (CTP) isolated from *Arabidopsis thaliana* EPSPS present to direct the CP4 EPSPS protein to the chloroplast, the site of the aromatic amino acid synthesis
CP4 EPSPS	1.4	The gene for CP4 EPSPS, isolated from *Agrobacterium* sp strain CP4 which allows for the selection of transformed cells on glyphosate
CTP1	0.26	Chloroplast transit peptide (CTP) isolated from the small subunit gene of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase (SSU1A) gene from *Arabidopsis thaliana* present to direct the GOX protein to the chloroplast, the site of the aromatic amino acid synthesis
gox	1.3	The gene encodes the glyphosate metabolizing enzyme glyphosate oxidoreductase (GOX) isolated from *Achromobacter* sp. (new genus *Ochrobactrum anthropi*) strain LBAA
NOS 3'	0.26	A 3' nontranslated region of the nopaline synthase gene which terminates transcription and directs polyadenylation
lacZ	0.24	A partial *E. coli lacI* coding sequence, the promoter P*lac* and a partial coding sequence for β-D-galactosidase or lacZ protein from pUC119
ori-pUC	0.65	The origin of replication for the pUC plasmids that allows for plasmid replication in *E. coli*
nptII	0.79	The gene for the enzyme neomycin phosphotransferase type II. This enzyme confers resistance to aminoglycoside antibiotics and thereby allows for selection of bacteria containing the plasmid

was increased when both plant selectable markers were used.

The plasmid size of PV-ZMBK07 is 7794 bp and of PV-ZMGT10 is 9427 bp.

Characterization of the genetic modification

Introduction

Several methods, including Southern and Western blot analyses, were used in the molecular characterization of MON 810. Possible novel genes and potential gene products that may have been present in MON 810, based on the information in the plasmid maps, are listed in Table 3.

Molecular characterization

Molecular characterization of the integrated DNA (I-DNA) included determination of:

- The insert number (number of integration sites within the corn genome)
- Copy number (number of each gene within the integrated DNA)
- Insert integrity.

Southern blot analysis was used to determine the above parameters.

MON 810 is compared against a non-transgenic control (counterpart) MON 818, which also has a Mo17 X (Hi-II X B73) background. MON 818 does not contain the genes encoding for B.t.k. HD-1 Cry1A(b), CP4 EPSPS or GOX proteins.

Table 3. Possible novel genes and potential gene products in MON 810.

Novel gene	*Novel gene product*	*Regulatory sequence*	*Other DNA sequences*
PV-ZMBK07			
cryIA(b)	*Bt* gene	Sequence is controlled by E35S promoter (0.6Kb) and a 0.8 Kb intron from the hsp70 gene (heat shock protein) is present to increase the levels of gene transcription. A 0.24 Kb nopaline synthase 3' nontranslated terminator sequence (NOS 3') attached to the *cry* gene provides the mRNA polyadenylation signals.	
lacZ-alpha	Betagalactosidase. A polylinker (region with multiple cloning sites) which allowed the cloning of the desired genes in the plasmid vector	Bacteria controlled promoter. Joined at the 3'end of NOS.	Followed by a 0.7 Kb region of replication for the pUC plasmids (*oripUC*) which allows replication of plasmids in *E. coli*.
nptII (marker for selection during construction of the plasmid derived from procaryotic transposon Tn5)	Neomycin phosphotransferase Resistance to aminoglycoside antibiotics (*i.e.*, kanamycin and neomycin)	Has its own bacterial promoter	
PV-ZMGT10			
gox gene cloned from *Achromobacter* sp. strain LBAA	Glyphosate metabolizing enzyme, glyphosate oxidoreductase (GOX). Degrades glyphosate by conversion to aminomethylphosphonic acid and glyoxylate	Joined to CTP1 peptide which targets the gene to the plastids, a chloroplast transit peptide. Derived from a subunit of ribulose - 1,5 bisphosphate carboxylase (SSU1A) gene from *Arabidopsis thaliana*. Under control of sequences as described above of E35S promoter, hsp70 intron and NOS 3' terminator	
CP4 EPSPS Isolated from *Agrobacterium* species strain CP4 which is resistant to glyphosate	5-enolpyruvylshimkimate-3-phosphate synthase	Joined to CTP2 peptide. Isolated from *Arabidopsis thaliana* EPSPS. The gene and CTP2 are about 1.7Kb in size. Under control of sequences as described above of E35S promoter, hsp70 intron and NOS 3' terminator	
Also contains the same *lacZ-alpha*, ori-pUC and *nptII* genes described above			

Insert Number

After digestion of extracted DNA with restriction enzyme NdeI, which does not cleave within either of the plasmids used to produce MON 810, analysis shows that a single band at approximately 5.5 Kilobase (Kb) was observed (Figure 3). This indicates that the DNA from the plasmid was present at one site. The rationale for this is that since there are no restriction sites inside the plasmids, the enzyme cleaves outside the inserted DNA releasing a fragment containing the inserted DNA and some adjacent genomic DNA. Since the plasmid DNA inserts randomly in the DNA of the plant, the distance between the inserted DNA and the restriction enzyme sites in the plant DNA will vary. If there are multiple insertion sites it is likely that cutting with a restriction enzyme that cleaves only outside the insert, the released fragment containing the inserted DNA would vary in size depending on the distance from the NdeI retriction site. You would expect to see multiple bands detected in the Southern if there were multiple insertion sites.

Insert Composition

Using a number of probes, tests show that the CP4 EPSPS, gox and ori-pUC sequences were not detected in MON 810, whereas nptII, E35S, hsp70 and the cryIA(b) were present within the 5.5 Kb NdeI fragment.

cryIA(b)

Digestion of DNA with NcoI/EcoRI to release the cryIA(b) gene followed by Southern blot analysis found an approximately 3.1 Kb fragment (Figure 4), which is "sufficient to encode an insecticidally active CryIA(b) protein." While "the positive hybridization control (lane 1 of figure 4) produced one 3.46 Kb fragment which corresponds to the expected size of cryIA(b) gene, the MON 818 DNA (lane 2) does not contain any bands, as expected for the control line. The MON 810 DNA contains one band of approximately 3.1 Kb."

Western blots indicate that the trypsin resistant protein of 63 Kilo-Dalton (kD) is produced by the integrated partial cryIA(b) gene in MON 810 (Figures 5 and 6). "Based on the Western blot data and efficacy of maize line MON 810, the cryIA(b) gene present produces an insecticidal CryIA(b) protein which provides effective, season long control of ECB."

CP4 EPSPS

Digestion with NcoI/BamHI would release any CP4 EPSPS genes present. Southern blots (Figure 7) indicate that MON 810 does not contain the 3.1 Kb fragment (the expected size of CP4 EPSPS) found in the gel spiked with the two plasmids. The CP4 EPSPS protein was not detected by ELISA in leaf, whole plant or grain tissues. Western blot analysis confirms the absence of the protein from leaf extracts (Figure 8, lane 9).

gox

Digestion with NcoI/BamHI would excise the gox gene, if present (NcoI to NcoI) and would be about 3.1 Kb in size. Southern blot analysis (Figure 7) indicates that MON 810 does not contain the gox gene. Neither was it detected by ELISA of plant tissues nor by Western blot analysis (Figure 9, lane 8).

Plasmid backbone

In order to detect backbone (nptII/ori-pUC) DNA, the nptII gene was used to probe a NcoI/EcoRI digestion of the Mon 810 DNA and PV-ZMBK07 plasmid DNA. When probed with the nptII gene, Southern analysis detected bands only for the plasmid at 2.5 Kb and 1.8 Kb. No signal was detected in the MON 810 DNA. Using the ori-pUC DNA a 1.8 Kb band for detected in the plasmid lane, but the ori-pUC) Southern blots (Figure 10) indicate that MON 810 contains no ori-pUC backbone sequences.

From the above information the interpretation is that one I-DNA containing approximately 4 Kb of DNA from the PV-ZMBK07 plasmid consisting of a portion of the enhanced E35S promoter (estimated to include one of two enhancer elements plus the promoter), the full length intron from the hsp70 gene (heat shock protein) and 2448 bp of the full length of 3468 bp cryIA(b) gene was inserted in the genome of MON 810, as shown in the schematic in Figure 11. No DNA from the bacterial vector backbone (*e.g.*, the pUC-origin of replication), the nptII, gox or CP4 EPSPS genes was detected. The submission states that, "MON 810 contains one integrated DNA contained on a 5.5 Kb NdeI fragment, which contains the E35S promoter, maize hsp70 intron and the cryIA(b) gene." Western analysis established that the trypsin resistant 63 kD B.t.k. HD-1 protein was produced in MON 810.

CryIA(b) gene integrity and activity

During particle acceleration plasmid DNA can be broken, resulting in integration of partial genes into the genomic DNA. Southern blots and genomic clone sequence established that the first 2448 bp of the 3468 bp cryIA(b) gene integrated into MON 810.

Modified plant expression

Molecular analysis of MON 810 "established that the line only contains cryIA(b) gene from plasmid PV-ZMBK07 and not the CP4 EPSPS, gox or nptII/ori-pUC genes. There is no evidence that any of the DNA contained in plasmid PV-ZMGT10 was inserted. MON 810 contains one integrated DNA fragment, contained on a 5.5 Kb NdeI fragment, which contains the E35S promoter, the maize hsp70 intron and the cryIA(b) gene."

The 'cry1a(b)' gene and its novel trait

The full length gene encoding for CryIA(b) protein has been described. While the genes inserted into MON 810 have been modified to enhance expression in corn, the amino acid sequence of expressed protein is identical to natural protein derived from B.t.k. The *cryIA(b)* gene fragment (Table 4) inserted into the MON 810 has been shown to be equivalent to the original bacterium source, as far as activity against insect pests. Table 4 is a summary of the gene product and its characteristics as submitted by the company.

Western analysis was used:

- To assess the protein products of the partial gene using antibodies specific to B.t.k. proteins
- To compare them to the *E. coli* produced protein standard and tissue extracts from other insect protected corn lines
- To look for any anomalous or unexpected protein products (ex. CP4 EPSPS and GOX (Figures 8, 9, and 12)), and
- To determine if the expressed B.t.k. protein was converted to the expected size of 63 kD trypsin-resistant protein product (Figures 5 and 6).

The company stated, "as is commonly observed in Western blot analysis of Bt proteins, multiple protein products were observed for line MON 810 and the other six insect protected corn lines (Figure 5, lanes 5-11). The full-length gene was not observed in line MON 810, as expected since the full-length gene was not incorporated into the corn genome. … MON 810 showed no apparent differences in the size ranges of the less than full length protein products … when compared to the other six insect protected lines produced with the same full length *cryIA(b)* gene. The predicted molecular weight of the B.t.k. HD-1 protein from the partial *cryIA(b)* gene is 92 kD but is not detected, probably due to low expression or rapid degradation to the trypsin-resistant product during the extraction process."

When the protein extracts are subjected to trypsin digestion, all seven lines show the core protein at approximately 63 kD (Figure 6).

The protein products in MON 810 and expected immuno-reactive products are similar to those in other IP corn lines, except for the lack of the full length B.t.k. HD-1 protein. No unexpected products were observed. The trypsin results demonstrate that the partial *cryIA(b)* gene inserted into MON810 produces the efficacious trypsin-resistant B.t.k. HD-1 protein.

Equivalence of bacterial and plant produced protein

Escherichia coli containing the B.t.k. gene was used to produce the quantities of the CryIA(b) protein needed to do tests, such as feeding trials. Therefore, the equivalence of the B.t.k. HD-1 protein produced in the IP corn was assessed against that from the *E. coli*. As the company states, the rationale is that: "the expression level of B.t.k. HD-1 in IP corn plants is extremely low. Therefore it is not feasible to isolate this protein from plants in sufficient quantity to conduct the various safety studies performed for the registration of this product. The best alternative was to isolate the functionally active B.t.k. HD-1 protein produced in a microbial host … and verify its physical and functional equivalence to the plant-expressed protein. Because the full length B.t.k. HD-1 protein (~ 131 kD) … would be expected to be rapidly converted to the trypsin-resistant core protein (~ 63 kD) upon ingestion … the trypsin-resistant core of the B.t.k. HD-1 protein was considered an appropriate test material to assess the full length B.t.k. HD-1 protein."

Two studies were presented. One study compares the B.t.k. HD-1 CryIA(b) from the commercial microbial

Table 4. Summary of gene products in the modified plant

Gene product	*Breakdown products, byproducts and metabolic pathways*	*Expression*	*Activity of the gene product in the plant*	*Activity of the geneproduct in the environment*
CryIA(b) delta endotoxin protein	Tryptic peptide is active ingredient	Constitutive	Does not affect other metabolic pathways	Rapidly degraded by digestion (non lepidopteran) and in soil

product DIPEL with leaf tissue samples from the plant expressed in line 754-10-1. Line 754-10-1 was produced with the same transformation plasmids as MON 810, but has higher expression of the protein and therefore it was possible to purify a greater quantity of the protein for equivalence studies. The study demonstrated that the B.t.k. HD-1 trypsin resistant core from corn and *E. coli* are equivalent in molecular weight and immunological reactivity. Both DIPEL and line 754-10-1 contain a full length B.t.k. protein band at approximately 134 kD and the same trypsin resistant core of approximately 63 kD. Western blots demonstrated that the B.t.k. HD-1 core from line 754-10-1 and MON 810 were equivalent, therefore it is concluded that the protein produced by the *E. coli* is an appropriate substitute for the protein in MON 810.

Multiple protein products occur in the plant extract, in the commercial microbial product DIPEL and in the full-length protein preparation used in the acute toxicity study. A question about other fragments in the Western blots that are reactive to the CryIA(b) antibody probes and the meaning were addressed with the following. There should be no concerns since the acute oral toxicity study would have included these fragments. Any fragments outside the trypsin resistant core 28-610 amino acids (1-28 and 611-1150) possibly present in corn tissues show no amino acid homology with known toxins or allergens. Comparison of the CryIA(b) full length protein sequence against the same sequence data base indicates there is no homology with known toxins or allergens. Digestive fate shows that the protein is rapidly digested and the commercial microbial product DIPEL contains many fragments as well.

Western blots of proteins after treatment with trypsin show equivalent bands and that the 63 kD core is in both samples. MON 810 produces a protein product whose trypsin resistant core is equivalent to the trypsin resistant core of the B.t.k. 754-10-1 protein in terms of size and activity.

In a newer test than the one for 754-10-1, the equivalency was established directly between the bacterially and plant produced proteins in MON 810 using Western blot analysis, which was, “highly sensitive, specific for B.t.k. proteins and allows for comparison of the apparent molecular weights of proteins possessing immunological cross-reactivity in complex mixtures.”

Leaf extracts of several IP lines and control lines were digested in trypsin to produce their B.t.k. HD-1 trypsin-resistant core protein and compared against the 63 kD *E. coli* produced trypsin- resistant core protein and the reference corn line MON 801 protein. The corn lines included MON 810 and its counterpart MON 818.

The Western blot analysis (Figure 6) shows a prominent band at the same molecular weight for MON 810 as the bacterial reference material. Smaller bands are also present and are assumed to be other B.t.k. HD-1 fragments. A band at 20 kD was seen in all extracts (both IP and control lines) and presumably represents a background non-specific cross-reactivity unrelated to the B.t.k. HD-1 protein.

“The results obtained in this study clearly establish that the B.t.k. HD-1 protein (as the trypsin-resistant core) produced by both *E. coli* and the IP corn lines analyzed in this study are equivalent. … the equivalence established … serves as the justification for using the safety data generated with the *E. coli*- produced (lot #I92017) protein to support the safety of the B.t.k. HD-1 protein expressed in these new insect protected corn lines.”

Expression

Samples of field-grown IP corn (MON 810) and a control (MON 818) collected from US field sites were used to assess the expression level of CryIA(b), CP4 EPSPS, GOX and NPTII proteins. The control lines (MON818 and 819) are not genetically modified, but have “background genetics representative of the test substances.” MON 818 is the counterpart for MON 810.

Leaf and grain samples were collected from six field sites distributed across the US corn growing regions, representative of the conditions where IP corn could be grown as a commercial product (2 in Illinois, 2 in Iowa, 1 each in Indiana and Nebraska). Whole plant and pollen samples were collected once from a single site (in Illinois). Over season leaf samples (taken every two weeks) were also collected from the Illinois site. Except for the pollen samples, B.t.k. HD-1, CP4 EPSPS and GOX protein levels were assessed using validated ELISAs specific for each protein. For the pollen samples, ELISA was used for the B.t.k. levels and Western blot analysis for CP4 EPSPS and GOX proteins.

Expression levels of the *cryIA(b)* gene were low in corn leaf, seed, pollen and whole plant tissues (Table 5). CP4 EPSPS, GOX and NPTII proteins were not detected. Average protein expression evaluated at six locations was 9.35 µg/g (f.w.) in leaves and 0.31 µg/g (f.w.) in seeds. Protein expression evaluated at one site was 4.15 µg/g (f.w.) in the whole plant and 0.09 µg/g (f.w.) in pollen, as determined from a single sample. Protein expression ranged from 7.93 to 10.34 µg/g (f.w.) in leaves, from 0.19 to 0.39 µg/g (f.w.) in grain and from

Table 5. Summary of levels of protein expression in MON 810 tissues[1]

Tissue	*Mean*	*Standard deviation*	*Range*
B.t.k. HD-1			
Leaf	9.35	1.03	7.93-10.34
Over season leaf[2]	9.78, 8.43, 4.91		
Pollen	0.09		
Whole plant[3]	4.15	0.71	3.65-4.65
Grain	0.31	0.09	0.19-0.39
CP4 EPSPS			
Leaf, over season leaf[2], whole plant, grain	nd	–	–
GOX			
Leaf, over season leaf[2], whole plant, grain	nd	–	–

[1] Unless indicated, values are in µg/g fwt (fresh weight). Unless indicated, the mean, standard deviation and range were over the six sites sampled. For those samples collected at one site see other notes.
[2] The numbers are means for the three separate sampling times collected at two week intervals.
[3] The mean and standard deviation were calculated from one site.

3.65 to 4.65 µg/g (f.w.) in the whole plant. Protein expression declined over the growing season as indicated by the Cry1A(b) levels present in leaves assayed over the growing season.

Tissue specificity, as stated by the company, was not expected since the *cryIA(b)* gene is "under the control of a CaMV promoter. Since this is a constitutive promoter that is not developmentally or tissue restricted, no specificity of expression to particular tissues is anticipated, although the CaMV promoter may be more or less active in certain cell types, as seen from the distribution of the CryIA(b) proteins in tissues." Neither were developmental stage specificity nor inducibility expected or found, because the CaMV promoter is a non-inducible constitutive promoter.

Western blot analysis of pollen (Figure 12) shows that the GOX gene is not expressed in MON 810 (lane 11).

For GM food assessments, expression in the consumed portion of the plant, in this case the grain, is the most important. The levels of expression in the grain of the novel protein range from 0.19 to 0.39 µg/g fresh weight.

The expression of the NPTII protein from the nptII gene, under the control of a bacterial specific promoter was tested for one of the lines used in this test (MON 801). The promoter was not active and, therefore, the gene does not express the protein in plant cells.

Breakdown products and metabolism

"The CryIA(b) protein does not have any specific breakdown products in plants. In the insect gut, the alkaline environment solubilizes the protein, which is then cleaved by proteases to yield the activated endotoxin. … As is commonly observed in Western blot analysis of Bt proteins, multiple polypeptides are apparent in extracts of plants expressing the *cryIA(b)* gene. These are recognized as breakdown products liberated as a result of protease action either in planta or during extraction."

Stability of the insert

MON 810 has been crossed into diverse corn genotypes for several generations and the efficacy of the line has been maintained. The molecular characterization of MON 810 was from the third generation of backcrossing and therefore the single insert appears to be stably integrated. Segregation data (Table 6) support a single active insert of the *cryIA(b)* gene segregating according to Mendelian genetics.

The *cryIA(b)* gene is stable through seven generations of crosses to one recurrent parent (B73) and six generations of crosses to a second, unrelated inbred (Mo17) (Table 7). The Chi square tests for the backcross to B73 and Mo17 did not deviate from expectations.

Assessment of possible toxicity

Introduction

Most of the studies were done using the insecticidally active trypsin-resistant core *E. coli* produced protein and not with plant-produced protein. The test proteins produced in *E. coli* are chemically and functionally the same as the plant-produced proteins (section 4.1.1).

Table 6. Segregation data of MON 810 progeny

Generation	*Description*	*Actual*	*Expected*	*ChiSq*
BC0F1[1]	Derived from cross of R0 with an inbred line	44:47	45.5:45.5	0.044*
BC1F1[2]	Derived from cross of BC0F1 plants to the same inbred line used to cross the R0 plant	10:4	7:7	1.786*
BC1F2 progeny[3]	Derived from cross of individual BC0F2 plants by a non-transgenic tested	69:181:77	81.75:163.5:81.75	4.138#

[1] *Expressed as number of expressing plants: number of non-expressing plants based on ECB feeding assay.*
[2] *Expressed as number of expressing plants: number of non-expressing plants based on CryIA(b) ELISA.*
[3] *Expressed as number of ear rows with homozygous number of expressing plants: number of ear rows with segregating plants: number of ear rows with homozygous susceptible plants based on ECB feeding assay.*
* *Not significant at p=0.05 (chi square = 3.94, 1df); # not significant at p=0.05 (chi square = 5.99, 2 df).*

Table 7. Stability of gene transfer based on segregation data for backcross derivatives of MON 810 with two unrelated inbred lines (B73 and Mo17)

Generation[1]	*Actual*	*Expected*	*Chi square*
BC6F1 (B73)	8:13	10.5:10.5	0.762*
BC5F1 (Mo17)	11:11	11:11	0.045*

[1] *Data expressed as number of expressing plants: number of non-expressing plants based on CryIA(b) ELISA.*
* *Not significant at p=0.05 (chi square = 3.84, 1 df).*

Some of the food safety considerations are based on CryIA(b) characterization and digestive fate studies in simulated gastric and intestinal fluids.

Protein specificity

The CryIA(b) protein in its crystalline form is insoluble in aqueous solution at neutral or acidic pH, however, is solubilized by the alkaline gut of larval insects. The solubilized protein is then activated by the proteases in the insect gut, which diffuses through the peritrophic membrane to the midgut epithelium, binding to specific high affinity receptors on the surface. This paralyzes the gut due to changes in electrolytes and pH causing the insect to stop feeding and die.

There are no similar receptors for the protein delta-endotoxins of Bt species on the surface of mammalian intestinal cells, therefore mammals are not susceptible to these proteins. Also, absence of adverse effects in humans is supported by numerous reviews on the safety of Bt proteins.

Comparison to toxin databases

The Cry1A(b) amino acid sequence was compared to known protein toxins. Similarity to a known toxin could trigger toxicological testing to address potential impact of the homology. B.t.k. HD-1 protein was compared to the amino acid sequences of 2632 toxins collected from public domain genetic databases (GenBank, EMBL, PIR and Swiss Prot) for homology. The results confirm that the B.t.k. HD-1 protein is homologous to Bt insecticidal crystal proteins, but no amino acid homology was detected for other protein toxins. The closest match is shown in Figure 14.

Mouse acute oral gavage

An acute oral toxicity study (7 days) was done with albino mice using *E. coli* produced protein (converted to the trypsin resistant core) and tested for purity, potency and stability. The protein was administered by gavage to mice at targeted doses of 0, 400, 1000 and 4000 mg/kg. The highest dose represents the maximum hazard dose concept outlined in US Subdivision M Guidelines for biochemical pesticides. One group was dosed with 4000 mg/kg of bovine serum albumin (BSA) as a protein control.

No treatment related adverse effects were observed (Table 8) and no statistical differences in body weight measures or food consumption were seen. No differences were seen in gross pathology between the groups. The LC50 of the B.t.k HD-1 (truncated) protein in mice is greater than 4000 mg/kg with the NOEL set at that value.

Potential toxic contaminants

In response to queries about possible changes in contaminant levels due to the introduction of the

Table 8. Results of acute mouse gavage test with CryIA(b) protein

Test group	*Weight pretest (g)*	*Weight at end (g)*	*Food consumption (mean g/day)*
Vehicle control (buffer)	31.1 [25.5]	30.8 [25.1]	5.3 [6.4]
Control (BSA 4000*)	31.1 [25.4]	31.0 [24.7]	6.2 [7.3]
400 Bt protein	31.1 [25.4]	30.5 [25.2]	5.3 [8.0]
1000 Bt protein	31.0 [25.3]	31.1 [25.0]	5.3 [8.0]
4000 Bt protein	31.0 [25.5]	30.5 [25.5]	5.5 [8.0/7.4]

*[females] / *mg/kg body weight*

Table 9. Dissipation of B.t.k. HD-1 protein insecticide activity in simulated gastric fluids

B.t.k. *HD-1*	*Tobacco budworm mortality*		*% change*
(µG/nL)	*0*	*2 minutes*	
0.75	29	3	-90
7.5	69	8	-88
75	94	24	-74

Table 10. Dissipation of B.t.k. HD-1 protein insecticide activity in simulated intestinal fluids

B.t.k. *HD-1*	*Tobacco budworm mortality*		*% change*
(µG/nL)	*0*	*19,5 hours*	
0.75	26	25	-4
7.5	76	61	-20
75	100	90	-10

cryIA(b) gene, the company notes that for alflatoxins, tests with MON 810 from the 1993 field trial did not detect alflatoxins and therefore the test was not repeated.

DIMBOA (2,4-dihodroxy-7-methoxy-1,4-bezoxanin-3-one) is not present in seeds of cereals and therefore does not pose a hazard to consumers of grain products.

Metabolic degradation in simulated gastric and intestinal fluids

Purified CryIA(b) protein (B.t.k HD-1 as expressed in *E. coli*) degrades rapidly in vitro using simulated digestive fluids. In the simulated gastric fluid, more than 90% of the protein degraded within two minutes, as detected by Western blot analysis (Figure 15). Lanes 6-11 are incubations at 0, 10, 20, 30, 60 and 120 seconds. Protein bioactivity detected using an insect bioassay also dissipated quickly with 74-90% of the added protein dissipated within two minutes (Table 9), the earliest time point measured. In a human stomach, approximately 50% of solid food empties to the intestines in two hours and liquids in about 25 minutes.

In the simulated intestinal fluid, the purified Cry1A (b) protein did not degrade substantially after 19.5 hours as assessed by Western blot (Figure 16, lanes 8-11 are incubations at 0, 60 minutes, 4 hours and 19.5 hours) and insect assay (Table 10). This was anticipated since the tryptic core of Bt insecticidal proteins is known to be relatively resistant to serine proteases like trypsin, a key protease in intestinal fluid. The insect used for the insect assay studies was the tobacco budworm.

Assessment of possible allergenicity

Humans consume large quantities of proteins daily and allergenic reactions are rare. One factor to consider is whether the source of the gene being introduced into the plants is known to be allergenic. Bt does not have a history of causing allergy. “In over 30 years of commercial use, there have been no reports of allergenicity to Bt, including occupational allergies associated with manufacture of products containing Bt.” Further, protein allergens need to be stable in peptic and tryptic digestion and the acid conditions of the digestive system if they are to reach and pass through the intestinal mucosa to elicit an allergenic response. Tests above show that the CryIA(b) protein does not survive under simulated gastric digestion. Another common factor of allergenic proteins is that they occur in high levels in the foods (*e.g.*, allergens in milk, soybean, peanuts). This is not the case with the CryIA(b) protein which is present at approximately 0.19-0.39 µg/g fresh weight of corn seed.

The company stated that Comparing sequences of amino acids to known allergens and gliadins is a useful first approximation of potential allergenicity or association with coeliac disease. A database of 219 protein sequences associated with allergy and coeliac disease assembled from genetic databases (GenBank, EMBL, PIR and Swiss Prot) was searched for sequences similar to B.t.k. HD-1 protein. “Most major … food allergens have been reported and the important IgE

binding epitopes of many allergenic proteins have been mapped. The optimal peptide length for binding is between 8 and 12 amino acids. T-cell epitopes of allergenic proteins and peptide fragments appear to be at least 8 amino acids in length. Exact conservation of epitope sequences is observed in homologous allergens of disparate species. … an immunologically relevant sequence comparison test for similarity … is defined as a match of at least eight contiguous identical amino acids." No biologically significant homology nor immunological significant sequence similarities were found. The best match is shown in Figure 17. The results establish that B.t.k. HD-1 protein shares no significant similarity with known allergen or gliadin proteins.

In summary, the low levels of the protein in the corn, combined with the digestive lability and the lack of homology with known allergenic sequences indicate that this protein does not possess allergenic properties. Coupled with the history of use as a microbial control agent with no allergenic concerns, this indicates that there is no reason to believe that CryIA(b) should pose any significant allergenic risks for the consumption of products produced from insect-protected corn.

Compositional analyses of key Components, evaluation of metabolites, food processing and nutritional modification

Introduction

Nutritional data are important relative to dietary exposure to corn products. While little whole kernel or processed corn is directly consumed by humans, corn based food ingredients such as starch and corn oil are used.

Compositional data

Samples for composition analysis were collected at the same time and from the same six sites used for analysis of expression levels in corn grain for a one-time experiment.

Corn seed (grain) samples of MON 810 and the control MON 818 were analyzed for the following components and compared with available literature values:

- Proximates (moisture, protein, ash, fat, crude fibre)*
- Calories
- Carbohydrate
- Starch
- Fatty acid profile*
- Sugar profile
- Amino acid composition*
- Tocopherols*
- Phytic acid*
- Minerals (calcium, phosphorus)* as summarized in Table 11.

Parameters with an asterisk (*) are considered for feed assessments, while the other parameters (often derived from calculations) are not commonly considered.

Carbohydrates were not measured but deduced using the following calculation: % carbohydrates = 100% - (% protein + % fat + % ash + % moisture). Also, calories was a derived parameter using the following USDA approved calculation: calories (kcal/100g) = (4 * % protein) + (9 * % fat) = (4 * % carbohydrates).

There were no significant differences for the variables protein, fat, ash, carbohydrates, calories and moisture between the IP corn and its control and both were within the reported values from the literature.

MON 810 contained eight amino acids (cystine, tryptophan, histidine, phenylalanine, alanine, proline, serine and tyrosine), which were statistically different from the control. The mean values for six of these (all except cystine and histidine) are within literature ranges. Cystine and histidine for both lines were statistically higher than the literature range but within the range (1.9-2.3%) observed for two (MON 800/801) similar lines. The level of histidine for MON 810 (3.1%) is within the range of another previous study for two lines of similar genetic backgrounds.

For fatty acids and carbohydrates measured (starch, fructose, glucose, sucrose and phytic acid), no significant differences were found between the control and the IP lines. Crude fiber values in MON 810 grain (2.6%) were statistically different from MON 818, but both values were within the literature range (2.0-5.5%).

Tocopherols are naturally present in corn oil and have vitamin E potency. The gamma tocopherol is one-tenth as active as the alpha and is therefore not considered an important component of the corn grain. MON 810 values for the alpha and gamma tocopherols were statistically similar to the control but the beta tocopherol differs statistically from the control (Table 11).

For the minerals calcium and phosphorus, calcium levels in MON 810 were statistically higher than for MON 818, but within ranges reported for tests with MON 800/801. No statistical differences were found for phosphorus.

Table 11. Comparison of compositional analysis for MON 810 corn grain with control (MON 818) and literature values

Component	*MON 810[1] mean (range)[2]*	*MON 818 mean (range)[2]*	*Literature value[4] mean (range) [MON 800/801 range]*
Proximate analysis			
Protein[3]	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]
Fat	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]
Ash[3]	1.6 (1.5-1.7)	1.5 (1.5-1.6)	1.4 (1.1-3.9) [1.5-1.8]
Carbohydrate[3]	82.4 (81.8-82.9)	82.7 (81.7-83.8)	not reported [80.8-83.0]
Calories/100g	408.4 (407.0-410.1)	408.5 (406.0-410.1)	not reported [412.6-415.7]
Moisture %	12.4 (11.0-14.4)	12.0 (10.6-14.2)	16.0 (7-23) [13.0-15.8]
Amino acid composition - nutritionally essential[5]			
Methionine	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]
Tryptophan	0.6* (0.5-0.7)	0.6 (0.4-0.6)	0.5-1.2 [0.5-0.6]
Threonine	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]
Phenyalanine	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]
Amino acids - nonessential[5]			
Alanine	8.2* (7.8-8.9)	7.8 (7.5-8.0)	6.4-8.0 [7.8-8.2]
Aspartic acid	7.1 (6.4-8.2)	6.6 (6.3-6.8)	5.8-7.2 [6.7-7.3]
Glutamic acid	21.9 (20.4-24.4)	21.1 (201.-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]
Serine	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]
Fatty acids[6]			
Palmitic (16:0)	10.5 (10.2-11.1)	10.5 (10.2-10.7)	7-19 [10.2-10.9]
Stearic (18:0)	1.9 (1.7-2.1)	1.8 (1.8-1.9)	1-3 [1.6-3.1]
Oleic (18:1)	23.2 (21.5-25.4)	22.8 (21.6-23.9)	20-46 [21.2-25.9]
Linoleic (18:2)	62.6 (59.5-64.7)	63.0 (61.8-64.6)	35-70 [58.9-65.0]
Linolenic (18:3)	0.8 (0.7-0.9)	0.9 (0.8-0.9)	0.8-2 [0.9-1.1]
Carbohydrates and fiber7			
Starch %	67.6 (65.3-69.7)	66.9 (64.6-69.0)	64-78.0 [63.7-71.5]
Crude fiber %	2.6* (2.5-2.8)	2.4 (2.3-2.5)	2.0-5.5 [1.98-2.61]
Sugars[8]			
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]
Phytic acid %	0.86 (0.81-0.91)	0.84 (0.79-0.91)	0.7-1.0 [0.45-0.57]
Tocopherols (mg/kg)			
Alpha	10.4 (9.7-11.3)	10.9 (9.9-12.1)	3.0-12.1 [7.3-12.3]
Beta	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]

(Continued)

Table 11. (cont.)

Component	*MON 810[1] mean (range)[2]*	*MON 818 mean (range)[2]*	*Literature value[4] mean (range) [MON 800/801 range]*
Inorganic components[7]			
Calcium %	0.0036* (0.0033-0.0039)	0.0033 (0.0029-0.0037)	0.01-0.1 [0.003-0.004]
Phosphorus %	0.358 (0.334-0.377)	0.348 (0.327-0.363)	0.26-0.75 [0.311-0.368]

*1 Values with * are statistically different from MON 818.*
2 Values reported are means of six samples from six sites. Ranges are the highest and lowest values across those sites.
3 Percent dry weight of samples.
4 Where there are more than one value, this indicates more than one published source.
5 Values for amino acids reported as percent of total protein.
6 Values for fatty acids are % total lipid. Other fatty acids were below the limit of detection of the assay.
7 Values on a dry weight basis.
8 Sugars measured as g/100g. Galactose, lactose and maltose were also measured, but values were below the limit of detection.

The company concluded, "Based on these data, it was concluded that there are no meaningful compositional differences between the IP corn lines ... and the control line, MON 818."

Additionally, the company summarized its Nutritional analysis conclusions, "nutritional composition … falls within the ranges of each nutrient measures for non-modified corn lines. It can be concluded that there appears to be no meaningful effect on corn plant nutrient levels. Phenotype was not affected in any of the numerous ways that were measured. Of the vitamins and minerals measured there were no practical differences reported. In terms of nutritional composition, MON 810 may be considered to be substantially equivalent to regular corn." ●

Etude de cas 2

Evaluation de la sécurité sanitaire du soja génétiquement modifié à haute teneur en acide oléique

Safety assessment of genetically modified high oleic acid soybeans

136 Description of the Recombinant-DNA Plant
137 Description of the Host Plant and Its Use as Food
137 Description of the Genetic Modification
137 Methods Used in the Genetic Modification
137 Novel Genes
139 Gene Constructs
139 Characterisation of the Genetic Modification
139 Selection of Plant Lines
142 Molecular Characterisation of the DNA Insertion in Sub-lines G94-1, G94-19 and G168
145 Summary of *Locus A*
145 Stability of the Genetic Changes
146 Conclusion
146 Antibiotic Resistance Genes
147 Characterization of Novel Protein
149 Assessment of Possible Toxicity
150 Assessment of Possible Allergenicity
151 Compositional Analyses of Key Components, Evaluation of Metabolites, Food Processing and Nutritional Modification
151 Field Studies and Data Collection
151 Key Nutrients
156 Summary of the Compositional Analysis
157 Endogenous Allergenic Proteins
158 Nutritional Impact
160 Human Nutritional Impact
161 Conclusions
163 References

Preface

The sale of food derived from high oleic acid soybean lines G94-1, G94-19 and G168 (Application A387) was approved in Australia and New Zealand in November 2000, following completion of a comprehensive safety assessment. Food Standards Australia New Zealand (FSANZ) conducts the safety assessments of genetically modified foods based upon internationally accepted principles for establishing the safety of foods derived from GM plants.

The findings of the FSANZ safety assessment were published as the "Final Risk Analysis Report: Application A387 - Food derived from high oleic soybean lines G94-1, G94-19, and G168".

Parts of the data and information on high oleic acid soybeans provided to FSANZ for assessment have been summarised into this case study for training purposes.

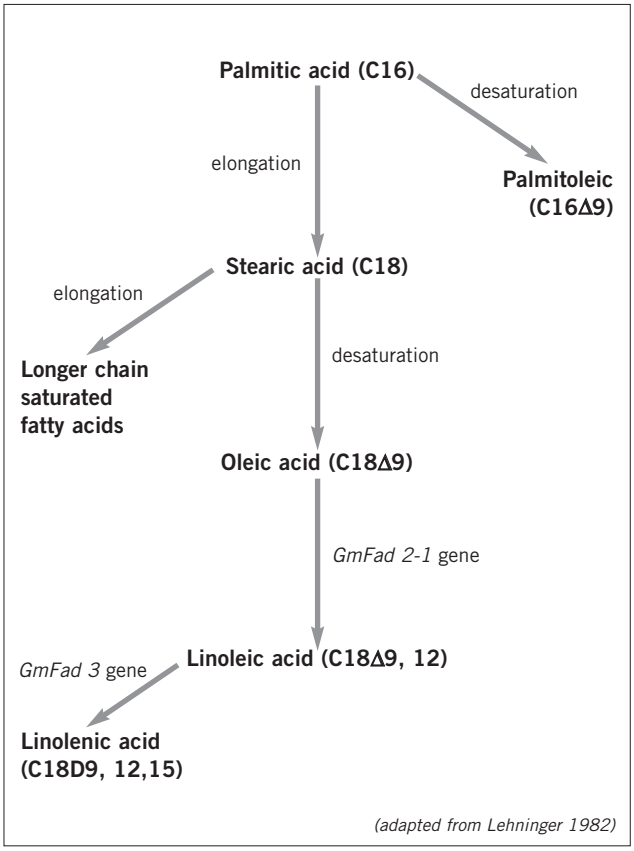
Disclaimer

In order to enhance the utility of the case study as a training tool, liberties were taken with the information provided in the original application. Certain information has been reduced to summaries and the present data as presented in the case study are only a subset of that actually submitted. The case study in no way constitutes a complete application not is it to be considered a complete safety assessment. To that end, the use of this information in the form of a training tool does not constitute an endorsement of the information or product nor should it be considered a reflection of the original submission.

Description of the recombinant-DNA plant

Optimum Quality Grains LLC (a joint venture between DuPont and Pioneer Hi-Bred International, Inc) originally intended to develop soybeans with two introduced traits: (a) increased lysine in the meal fraction and (b) increased oleic acid, a monounsaturated fatty acid, in the oil fraction. However, during development, it was decided not to pursue the high-lysine trait. The new variety therefore has been genetically modified only to contain increased levels of oleic acid. The soybeans are referred to as high oleic acid soybeans.

The high oleic acid trait was generated by the transfer of a second copy of a soybean fatty acid desaturase gene (GmFad 2-1) to a high yielding commercial variety of soybean. The fatty acid desaturase is responsible for the synthesis of linoleic acid, which is the major polyunsaturated fatty acid present in soybean oil. The presence of a second copy of the fatty acid desaturase gene causes a phenomenon known as "gene silencing" which results in both copies of the fatty acid desaturase gene being "switched off", thus preventing linoleic acid from being synthesised and leading to the accumulation of oleic acid in the developing soybean seed. The pathway for the synthesis of long chain fatty acids in plants is depicted below.



Soybean oil has poor oxidative stability due to naturally high levels of polyunsaturated fatty acids (such as linoleic acid). High oleic acid soybean oil is considered to have superior properties to that of standard soybean oil because of its reduced levels of the oxidatively unstable polyunsaturated fatty acids. This means that high oleic acid soybean oil may be used for a number of food applications, including deep fat frying, without the need for additional processing, such as chemical hydrogenation. High oleic acid soybean oil is also considered to offer improved nutritional properties compared to conventional soybean oil or partially hydrogenated soybean oil because of the increased levels of monounsaturated fatty acids.

Oil from high oleic soybeans is intended to be used predominantly for spraying and frying applications in the

food industry and food services and might replace heat stable fats and oils such as hydrogenated soybean and rapeseed oil or palm oil/vegetable oil blends.

Description of the host plant and its use as food

Soybeans (*Glycine max*) are grown as a commercial crop in over 35 countries worldwide and have a long history of safe use as both human food and stockfeed. The major producers of soybeans are the United States, Argentina, Brazil and China, accounting for 90% of world production.

There are three major soybean commodity products: seeds, oil and meal. There is only limited feed use, and no food use, for unprocessed soybeans, as they contain toxicants and anti-nutritional factors, such as lectins and trypsin inhibitors, making them unsuitable for human consumption. Appropriate heat processing inactivates these compounds.

Whole soybeans are used to produce soy sprouts, baked soybeans, and roasted soybeans. The soybean hulls can be processed to create full fat soy flour and the traditional soy foods such as miso, tofu, soymilk and soy sauce.

Before processing, soybeans are graded, cleaned, dried and de-hulled. The soybean hulls are further processed to create fibre additives for breads, cereals and snacks and are also used for stockfeed. After de-hulling, soybeans are rolled into full fat flakes that may be either used in stockfeed or processed further into full fat flour. Crude soybean oil is then extracted from the flakes by immersing them in a solvent bath. Crude lecithin is then separated from the oil, which is further refined to produce cooking oil, margarine and shortening. After the oil is extracted from the flakes, the solvent is removed and the flakes are dried for use in the production of soy flour, soy concentrates and soy isolates. De-fatted soy flakes are also used in stockfeed.

Finished food products containing soybean ingredients therefore include beer, noodles, breads, flours, sausage casings, pastries, crackers, meat substitutes, milk substitutes and confectionery among other things.

The elite soybean cultivar A2396, which has been used as the host for the high oleic acid trait described in this application, is an Asgrow Seed Company early Group II maturity soybean variety that has high yield potential. Protein and oil characteristics are said to be similar to other soybeans at 40% protein and 22% oil on a dry weight basis.

Description of the genetic modification

Methods used in the genetic modification

Plasmid DNA carrying the genes of interest, was introduced into meristem tissue of elite soybean line A2396 by microprojectile bombardment, or biolistic transformation. The bombarded cells are incubated on a tissue culture medium, which supports callus growth. The cells that have taken up the DNA were selected by picking those that express an introduced marker gene, GUS (a fluorescent marker protein).

Novel genes

The *GmFad 2-1* gene

In soybean, there are two Fad 2 genes, but only the *GmFad 2-1* gene is expressed in the developing seed (Heppard *et al.*, 1996). The expression of *GmFad 2-1* increases during the period of oil deposition, starting around 19 days after flowering, and its gene product is responsible for the synthesis of the polyunsaturated fatty acids found in the oil fraction. The second Fad 2 gene (*GmFad 2-2*) is expressed in the seed, leaf, root and stem at a constant level and its gene product is responsible for the synthesis of the polyunsaturated fatty acids present in cell membranes.

The presence of a second copy of the *GmFad 2-1* gene in the soybean causes a phenomenon known as "gene silencing" which results in both copies of the *GmFad 2-1* gene (the transferred copy as well as the original soybean copy) being "switched off", thus preventing linoleic acid from being synthesised and leading to the accumulation of oleic acid in the developing soybean seed.

Gene silencing in plants can occur at both transcriptional (TGS) and post-transcriptional (PTGS) levels. The primary mechanism of TGS is thought to be methylation of the promoter sequences. Methylation of promoters is thought to block their interaction with transcription factors or alter the chromatin structure of the DNA thus suppressing transcription, however these mechanisms remain unclear (Wang and Waterhouse, 2001). PTGS was initially referred to as 'co-suppression' because in experiments involving the transformation of petunia with a sense chalcone synthase transgene the expression of both the transgene and the corresponding endogenous gene was suppressed. PTGS involves the

pBS43 (10303 base pairs):

pML102 (6247 base pairs):

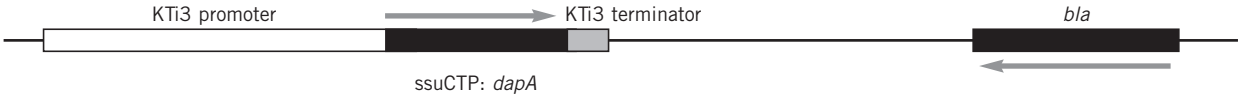


Table 1: Description of the gene expression cassettes in pBS43 and pML102

Cassette	*Genetic element*	*Source*	*Function*
GmFad 2-1 expression cassette (pBS43)	ß-conglycinin promoter	α^1-subunit of β-conglycinin seed storage protein of soybean (Barker *et al.* 1988)	Seed specific promoter that allows high level gene expression during seed development
	GmFad 2-1 coding region	Protein coding sequence of the δ-12 fatty acid desaturase from soybean (Okuley *et al.* 1994, Heppard *et al.* 1996)	The endogenous enzyme adds a second double bond to oleic acid thus converting it to linoleic acid
	phaseolin 3' terminator	The 3' terminator region from the phaseolin seed storage protein of green bean *Phaseolis vulgaris* (Doyle *et al.* 1986)	Contains signals for termination of transcription and directs polyadenylation
GUS expression cassette (pBS43)	35S promoter	A promoter derived from the cauliflower mosaic virus (CaMV) (Odell *et al.* 1985)	Promoter of high level constitutive gene expression in plant tissues
	Cab 22L non-translated leader	The 5' untranslated leader from the photosynthetic *22L* chlorophyll a/b binding protein (Cab22L) promoter of *Petunia hybrida* var. Mitchell (Harpster *et al.* 1988)	The untranslated leader sequence helps to stabilise mRNA and improve translation
	uidA coding region	Protein coding sequence of the enzyme β-glucuronidase (*uidA* gene) from *Escherichia coli* (Jefferson *et al.* 1985)	Colourimetric marker used for selection of transformed plant lines
	NOS 3'	The 3' terminator region of the nopaline synthase gene from the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker *et al.* 1982, Bevan *et al.* 1983)	Contains signals for termination of transcription and directs polyadenylation
dapA expression cassette (pML102)	Kti3 promoter	Promoter from Kunitz trypsin inhibitor gene 3 of soybean (Jofuki and Goldberg 1989).	Seed specific promoter that allows high level gene expression during seed development.
	ssu CTP	The N-terminal chloroplast transit peptide sequence from the soybean small subunit of Rubisco (Berry-Lowe *et al.* 1982)	Directs the protein into the chloroplast which is the site of lysine biosynthesis
	dapA coding region	Coding sequence of the *Corynebacterium dapA* gene encoding the lysine insensitive version of the enzyme dihydrodipicolinic acid synthase (DHDPS) (Bonnassie *et al.* 1990, Yeh *et al.* 1988)	Expression of *Corynebacterium* DHDPS deregulates the lysine biosynthetic pathway resulting in accumulation of free lysine (Falco *et al.* 1995)
	Kti3 3' terminator	The 3' terminator region from Kunitz trypsin inhibitor gene 3 from soybean (Jofuki and Goldberg 1989)	Contains signals for termination of transcription and directs polyadenylation

Table 2: Description of other genetic elements transferred to high oleic acid soybeans

Cassette	*Genetic element* *Source*	*Function*
lac	An incomplete copy of the *lac* operon which contains a partial *lacI* coding sequence, the promoter P_{lac}, and a partial coding sequence for β-D-galactosidase (*lacZa'*)	These genes are not intact and no longer function in *E. coli*
ori	Origin of replication from the high copy number *E. coli* plasmid pUC19	Allows plasmids to replicate in *E. coli*
bla	Gene coding for the enzyme β-lactamase from *E. coli*	Confers ampicillin resistance to *E. coli*
f1 ori	Bacteriophage f1 origin of replication.	Origin of replication recognised by bacteriophage f1 to produce single stranded DNA. The f1 origin is not recognised unless a phage f1 is present

failure to accumulate messenger RNA in the cytoplasm and thus no expression products are produced. It is now widely accepted that double stranded RNA can cause PTGS in plants through a process that involves sequence-specific RNA degradation (Voinnet, 2002).

The *dapA* gene

The *dapA* gene codes for the enzyme dihydrodipicolinic acid synthase (DHDPS), which is responsible for catalysing the first step in the metabolic pathway for the synthesis of the essential amino acid lysine (Brock *et al.*, 1984). The DHDPS found in plants is inhibited by lysine, whereas the *dapA* gene transferred to the soybeans, which was derived from *Corynebacterium*, codes for a form of DHDPS that is insensitive to inhibition by lysine. In previous experiments it has been shown that expression of the lysine-insensitive DHDPS, encoded by the *Corynebacterium dapA* gene, will result in more than a 100-fold increase in the accumulation of free lysine in the seeds, essentially doubling total seed lysine content (Falco *et al.*, 1995).

The objective of transforming soybean with both the soybean *GmFad 2-1* gene and the *Corynebacterium dapA* gene was to produce transgenic soybeans with increased lysine in their meal fraction, due to expression of the lysine insensitive form of DHDPS, and a reduced level of polyunsaturated fatty acids in their oil fraction, due to silencing of the *GmFad 2-1* gene (described above).

uidA gene

In addition to the primary genes, the soybeans also contain a visual marker gene, the *uidA* gene from *Escherichia coli* (Jefferson *et al.*, 1985). The protein product of this gene, β-glucuronidase (GUS), is an enzyme that can be used to catalyse a colourimetric reaction resulting in the production of a blue colour in transformed plant tissues.

Gene constructs

Two circular plasmids were used in the transformation, pBS43 and pML102, containing the three gene expression cassettes, one for each gene of interest, *GmFad 2-1* and *dapA*, and one for the reporter gene, *uidA*. Both plasmids pBS43 and pML102 also contained the antibiotic resistance marker gene, *bla*. The plasmids are shown in the diagram (Fig. 1) in linear form, with the novel genes in black. Table 1 contains a description of each gene and its regulatory elements.

Other genetic elements

In addition to the gene expression cassettes described in Table 1 above, a number of other genetic elements, including the antibiotic resistance marker gene, were also present in the plasmid DNA. These genetic elements are described in Table 2.

These genetic elements are present in most *E. coli* cloning vectors and are well described (Sambrook *et al.*, 1981). They are used to assist in the manipulation of DNA sequences as well as direct gene expression in *E. coli*.

Characterisation of the genetic modification

Selection of plant lines

The method used in the transformation did not necessarily result in the successful transfer of both plasmids to the soybeans, therefore a large number of transformed plants needed to be screened to identify those with the two traits of interest.

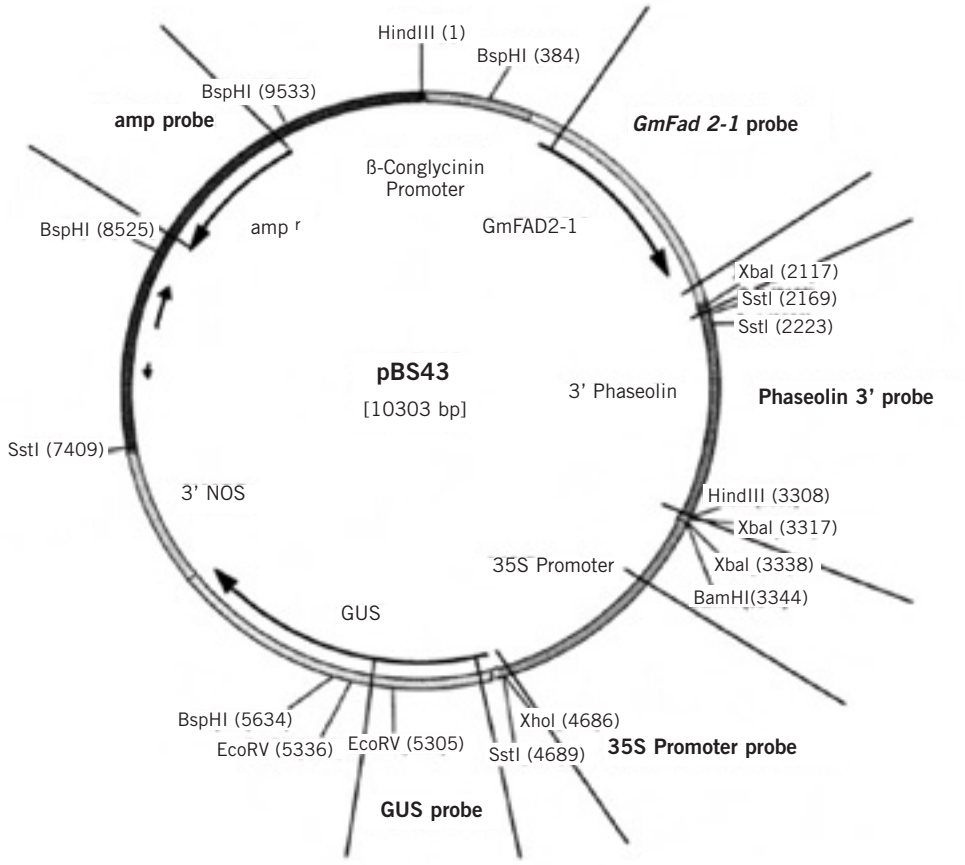


Figure 1: Plasmid map of pBS43. Figure indicates the location of hybridisation probes and restrictions enzyme sites used for Southern blot analysis of high oleic soybeans.

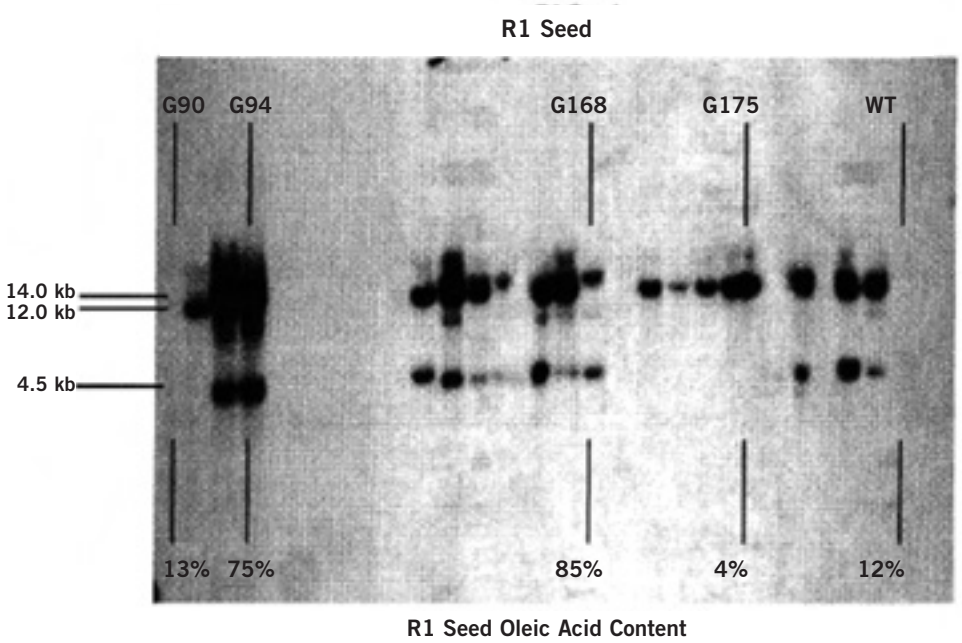


Figure2. Southern blot of DNA isolated from leaf tissue of event 260-05 R1 plants. Plants were grown from chipped seeds analysed for fatty acid composition. The genomic DNA was digested with *BamHI* and probed with the phaseolin 3' probe to detect the integration of the *GmFad 2-1* construct.

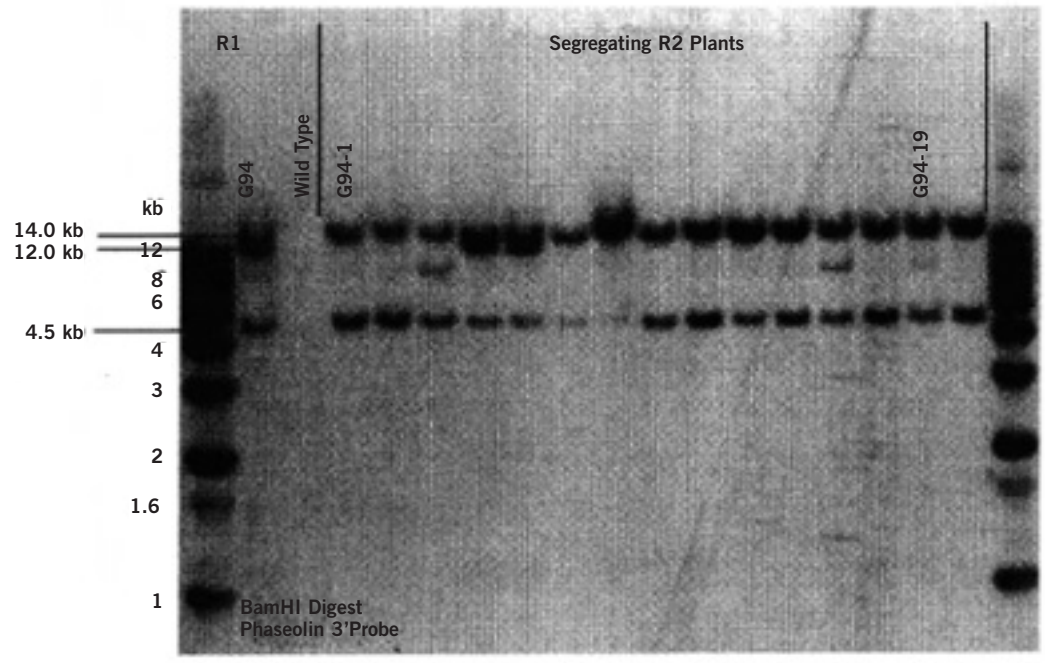


Figure 3. Southern blot on R1 and R2 leaf tissue from G94 R1 seed. The genomic DNA was digested with BamHI and probed with the phaseolin 3' probe to detect the integration of the GmFad 2-1 construct. The G94 seed has three different sized fragments of DNA that hybridise with the probe. G94-1 and G94-19 have only two – at 14.0 Kb and 4.5 Kb.

As the GUS reporter gene is linked to the *GmFad 2-1* gene, the population of transformed plants was first screened for GUS activity. The GUS-positive plants were then tested using the polymerase chain reaction (PCR), for the presence of the *GmFad 2-1* gene. From this initial screening one plant (event 260-05) was identified. Small samples were taken from the seeds of plant 260-05 (the R1 generation) and screened for fatty acid composition and lysine content. Four different fatty acid profiles in combination with lysine changes were identified among the R1 seeds:

1. Seeds with ≥80% oleic acid content and normal lysine levels (G168);
2. Seeds with about 72% oleic acid content and increased lysine levels (G94);
3. Seeds with about 4% oleic acid content and increased lysine levels (G175); and
4. Seeds with oleic acid and lysine levels similar to that of the untransformed line A2396 (G90).

Southern blot hybridisation was used to analyse genomic DNA from seeds from the four transformed lines described above. Southern blotting is a sensitive technique used to detect specific sequences within DNA fragments that have been separated according to size using gel electrophoresis (Southern, 1975). This provides information on the number of inserts of the T-DNA, and the number of insertion sites (i.e., the number of loci) in the genome of the soybean plants. It is also possible to some extent to determine whether the inserted T-DNA copies are whole (intact) or partial copies.

Genomic DNA was extracted from the seed samples, digested with the restriction enzyme BamHI and probed with the 3' region of the phaseolin terminator to detect the *GmFad 2-1* gene expression cassette. BamHI cuts once in the plasmid pBS43 and would be expected to result in one hybridizing band for each copy of the plasmid inserted into the genome. The map of pBS43 with restriction sites and locations of probes is shown in Figure 1. The results of the Southern blot are shown in Figure 2.

Three different banding patterns can be seen in Figure 2 The results for G168 show two hybridising bands of 14.0 Kb and 4.5 Kb, indicative of two *GmFad 2-1* genes. G175 has one band only, corresponding to 12.0 kb. All three hybridising fragments are present in G94.

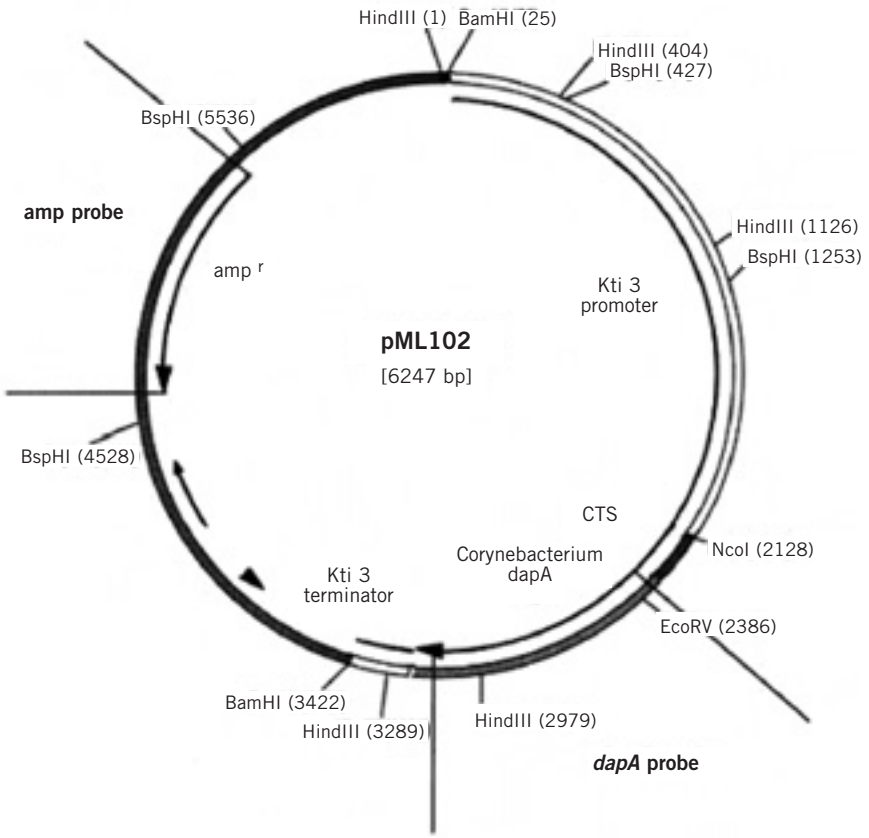


Figure 4: Plasmid map of pML102. Figure indicates the location of hybridisation probes and restriction enzyme sites used for Southern blot analysis of high oleic soybeans.

Interpretation of this DNA hybridisation pattern in Figure 2 suggests that in the original transformation event (event 260-05) the *GmFad 2-1* construct was integrated at two different loci in the soybean genome. Line G168 contains one of the loci (designated *locus A*) consisting of two linked *GmFad 2-1* genes as indicated by the two hybridising fragments of 14.0 kb and 4.5 kb. Line G175 contains the second locus (*locus B*) consisting of a single *GmFad 2-1* gene. G94 contains both loci and thus showed all three hybridising fragments. Only G168 and G94 were selected for further analysis because these showed the desired phenotype of high oleic acid content. Southern blotting of G94 also showed the presence of the *dapA* gene responsible for the increased lysine phenotype.

As G94 plants contained both *locus A* and *locus B*, an additional round of selection was necessary on the segregating R2 plants to isolate plants containing *locus A* and not *locus B*. Southern blot analysis on R2 leaf tissue grown from G94 R2 seed identified two sub-lines, G94-1 and G94-19, that contained *locus A* (Figure 3) without locus B, which had been removed through segregation. *Locus B* was not further characterised.

The two sub-lines, G94-1, G94-19 and line G168, identified as containing the *GmFad 2-1* locus A, were selected as the high oleic acid soybeans for subsequent analyses. The application for food use relates to these sub-lines only. None of these three lines express the high lysine trait.

Molecular characterisation of the DNA insertion in sub-lines G94-1, G94-19 and G168

To fully characterise the insertion in G94-1, G94-19 and G168, six different DNA hybridisation probes based on the genetic fragments in pBS43 (Figure 1) and pML102 (Figure 4) were used for Southern blot analysis. The six probes used were *GmFad 2-1*, phaseolin 3', GUS, 35S

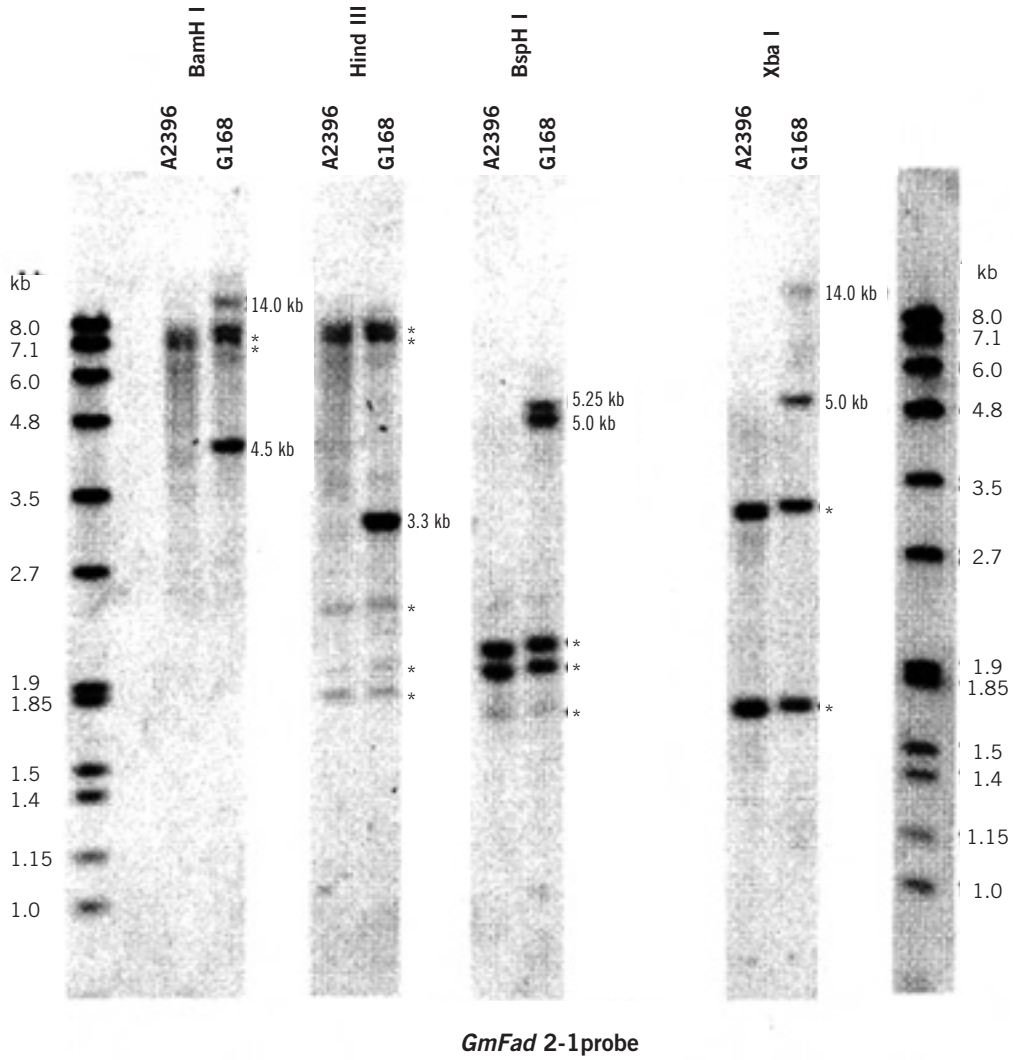


Figure 5a. Southern blot analysis of DNA isolated from R6 leaf tissue of high oleic soybean sub-line G168 and from control line A2396. Genomic DNA was digested with the indicated enzymes and hybridised with the *GmFad 2-1* probe. The underlined molecular weight sizes indicate the sizes of the hybridising transgene for each digest and the asterisks indicated the hybridising endogenous *GmFad 2-1* bands.

promoter, Amp, and *dapA*. Genomic DNA was isolated from R6 leaf tissue from two plants each of G94-1, G94-19, and G168 and the control line A2396. The DNA was digested with six different restriction enzymes to fully characterise the insertions. The results of the Southern blot analysis are presented in Figures 5a and 5b. Table 3 shows the sizes of DNA fragments expected from the different digestions, if it is assumed that one intact copy of plasmid pBS43 was inserted into the genome. For comparison, the sizes of fragments actually obtained in the Southern blot analyses are shown in Table 4.

From the information obtained in these Southern blot analyses, it was possible to deduce a map of the inserted DNA present in the soybean lines (Figures 6a and 6b).

Characterisation of the R6 generation also revealed that a truncated *dapA* gene had been integrated into another locus in the genome of the G94 sub-lines and G168 (*locus C*). These Southern data are not presented in this case study.

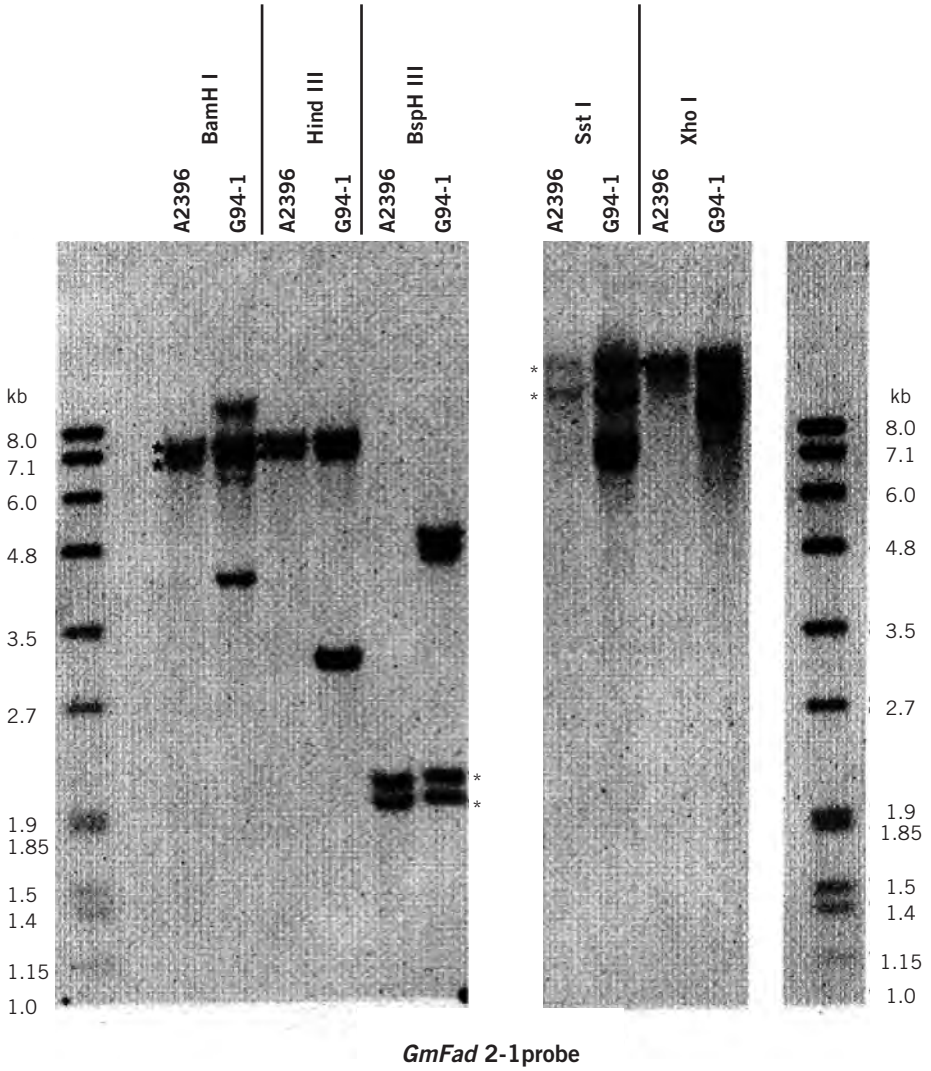


Figure 5b. Southern blot analysis of DNA isolated from R6 leaf tissue of high oleic acid soybean sub-line G94-1 and from control line A2396. Genomic DNA was hybridised with the *GmFad 2-1* probe.

Table 3. Expected fragment sizes (kb). Summary chart of expected hybridising fragment sizes based on the sequence of pBS43 if inserted into the genome as one intact copy

Restriction Enzyme	***Hybridisation Probe***				
	GmFad 2-1	Phaseolin 3'	GUS	35S Promoter	*amp*
HindIII	3.3	3.3	7.0	7.0	7.0
BamHI	Border fragment	Border fragment	Border fragment	Border fragment	Border fragment
BspHI	5.25	5.25	5.25	5.25	1.0
SstI	5.1	2.5	2.7	2.5	5.1
XbaI	9.1	1.2	9.1	9.1	9.1
XhoI	Border fragment	Border fragment	Border fragment	Border fragment	Border fragment

Table 4. Actual fragment sizes (kb)[1]. Summary chart of Southern blot results describing the DNA fragment sizes that hybridised to the indicated probes when high oleic soybean genomic DNA was digested with the listed restriction enzymes

Restriction Enzyme	***Hybridisation Probe***				
	GmFad 2-1	Phaseolin 3'	GUS	35S Promoter	*amp*
HindIII	3.3[2]	3.3	6.5	6.5	6.5 4.2 3.3
BamHI	14.0 4.5	14.0 4.5	6.5	6.5	14 6.5 2.8
BspHI	5.25 5.0	5.25 5.0	5.25 5.0	5.25 5.0	1.4 1.0
SstI		2.5	2.7 1.7	2.5	
XbaI	14.0 5.0	1.5	6.7	6.7	
XhoI			4.4		

[1] Hybridising fragments larger than 10 kb should be considered as approximate sizes due to the limitations of the gel system for separating large fragments.

[2] Fragment sizes that are bold and underlined indicate two copies of the fragment are released by digestion with the listed enzyme. These fragments may give stronger hybridisation signals.

Figure 6a and 6b: Schematic diagram of insert at locus A in high oleic acid soybeans. The top section of each diagram details the inserted genetic elements from the plasmids and their orientation. The bottom section diagrams the hybridising fragments for each restriction enzyme shown in Table 4. The inserted DNA is drawn to scale whereas the bordering soybean genomic DNA is not drawn to scale.

Summary of 'Locus A'

The mapping of *locus A* shows that one copy of pBS43, opened in the *bla* gene, inserted intact into the genome. A second copy of pBS43, opened in the *uidA* gene, inserted as an inverted repeat relative to the first copy. At the 5' end of *locus A*, proceeding from the soybean genomic DNA junction to the first copy of pBS43, a fragment of pML102, containing only the vector region with the *bla* gene, was inserted. Therefore, the insertion at locus A consists of two intact copies of the *GmFad 2-1* expression cassette, one intact copy of the *uidA* expression cassette and a truncated copy of the *uidA* gene, and at least two intact copies of the *bla* gene plus one truncated copy.

A series of Northern blots (for RNA expression), Western blots (for protein expression) and amino acid profiles were done on sub-lines G94-1, G94-19 and G168 to confirm that the functional *dapA* gene at *locus B* was absent. However, additional Southern blots (data not shown), using a *dapA* probe, indicated that a truncated *dapA* gene expression cassette had become integrated into another locus in the genome (*locus C*). This locus segregates independently of *locus A*. The truncated *dapA* gene is non-functional as indicated by Northern, Western and amino acid analyses.

Stability of the genetic changes

Sub-lines G94-1, G94-19 and G168 differ from the parent line A2396 in that the fatty acid profile has been altered to produce oil containing about 82-85% oleic acid with consequent low levels of linoleic (< 1%) and linolenic acids (< 2.5%). This compares to a range of 19–30% oleic acid reported for standard edible soybean oil (Codex Alimentarius 1989).

To evaluate the genetic and phenotypic stability of the sub lines, genomic DNA from a number of generations of high oleic acid soybeans, homozygous for the *GmFad 2-1 locus A*, were subject to detailed Southern blot analyses. The applicant reports that sub lines G94-1, G94-19 and G168 had been kept separate for six generations and all were shown to maintain identical Southern banding patterns over that period. Analysis of the oleic acid content of seeds from eight different generations also showed that the fatty acid phenotype was stable over this period, with average oleic acid content greater than 80%. In addition, the high oleic acid trait is also reported by the applicant to be stable over a number of different growing environments when compared to the elite parent line and a high oleic acid

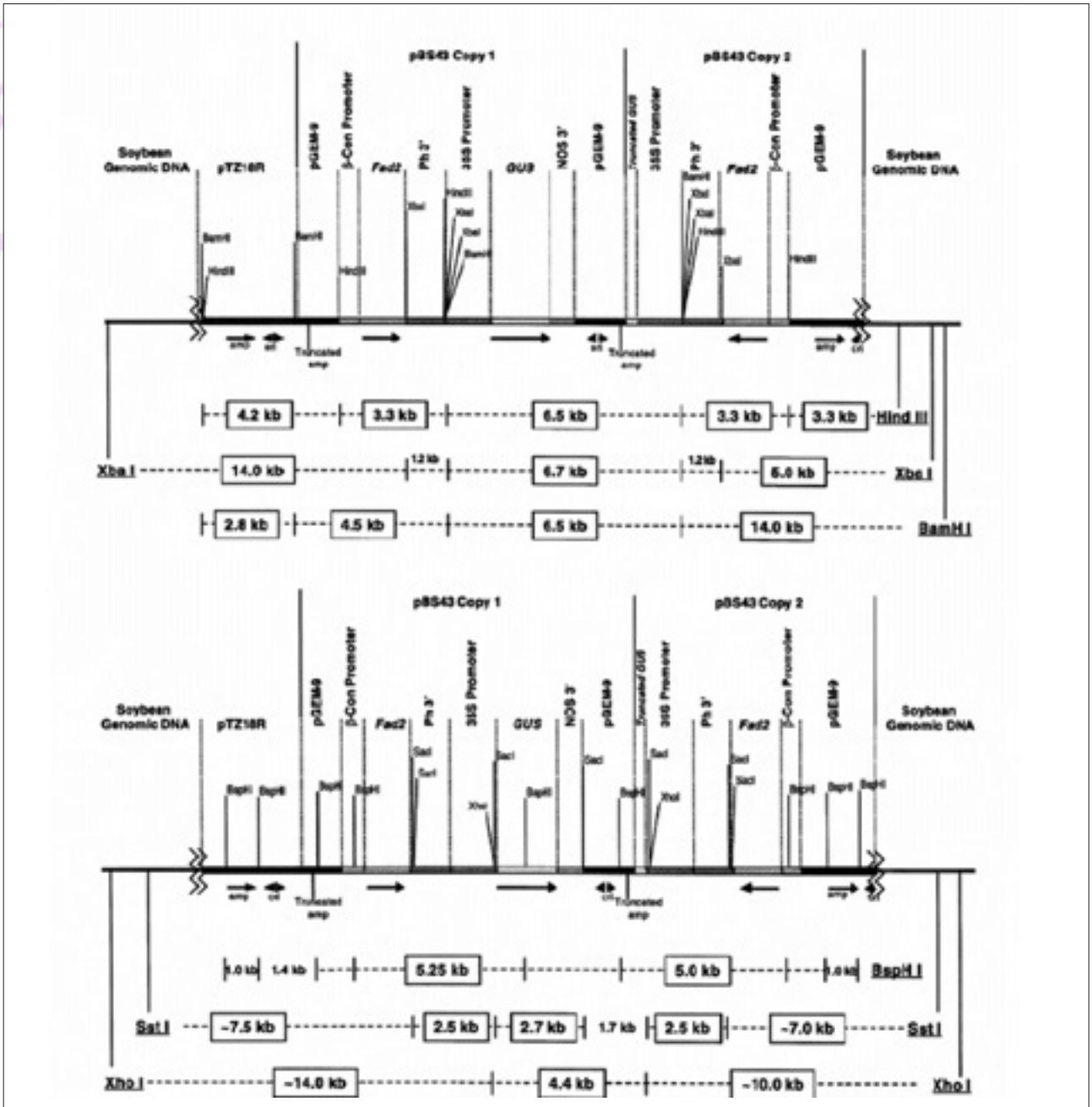


Figure 6a (top) and 6b (bottom). Schematic diagram of insert at *locus A* in high oleic acid soybeans. The top section of each diagram details the inserted genetic elements from the plasmids and their orientation. The bottom section diagrams the hybridising fragments for each restriction enzyme shown in Table 3.4. The inserted DNA is drawn to scale whereas the bordering soybean genomic DNA is not drawn to scale.

soybean line derived through conventional breeding methods.

Conclusion

The *GmFad 2-1* genes in the three sub-lines of high oleic acid soybeans are stably integrated and all three lines are phenotypically and genetically stable over multiple generations and in various environments.

Antibiotic resistance genes

Antibiotic resistance genes can be present in some transgenic plants as a result of their use as marker genes to select transformed cells. It is generally accepted that there are no safety concerns with regard to the presence in the food of antibiotic resistance gene DNA per se (WHO 1993). There have been concerns expressed, however, that there could be horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes from ingested food to

microorganisms present in the human digestive tract and that this could compromise the therapeutic use of antibiotics.

This section of the case study therefore concentrates on evaluating the human health impact of the potential transfer of antibiotic resistance genes from high oleic acid soybeans to microorganisms present in the human digestive tract.

The two plasmids used to transform soybean line A2396 – pBS43 and pML102 – both contained a copy of the *bla* gene under the control of a bacterial promoter. The *bla* gene encodes the enzyme β-lactamase and confers resistance to a number of β-lactam antibiotics such as penicillin and ampicillin. Molecular characterisation of the high oleic acid soybean lines has confirmed the presence of two intact copies of the bla gene along with its bacterial promoter. The *bla* gene is not itself expressed in the high oleic acid soybean lines (see Section 6.7).

The first issue that must be considered in relation to the presence of an intact bla gene in the high oleic acid soybeans is the probability that this gene would be successfully transferred to, and expressed in, microorganisms present in the human digestive tract. The following steps would be necessary for this to occur:

- Excision of DNA fragments containing the bla gene and its bacterial promoter;
- Survival of DNA fragments containing the bla gene in the digestive tract;
- Natural transformation of bacteria inhabiting the digestive tract;
- Survival of the bacterial restriction system by the DNA fragment containing the bla gene;
- Stable integration of the DNA fragment containing the bla gene into the bacterial chromosome or plasmid;
- Maintenance and expression of bla gene by the bacteria.

The transfer of a functional bla gene to microorganisms in the human digestive tract is considered to be highly unlikely because of the number and complexity of the steps that would need to take place consecutively.

The second and most important issue that must be considered is the potential impact on human health in the unlikely event successful transfer of a functional bla gene to microorganisms in the human digestive tract did occur.

In the case of the bla gene, the human health impacts are considered to be negligible because ampicillin-resistant bacteria are commonly found in the digestive tract of healthy individuals (Calva *et al.*, 1996) as well as diseased patients (Neu 1992). Therefore, the additive effect of a bla gene from the high oleic acid soybeans being taken up and expressed by microorganisms of the human digestive tract would be insignificant compared to the population of ampicillin resistant bacteria already naturally present. In addition, ampicillin has now largely been replaced by more potent forms of β-lactam antibiotics or is only used in combination with drugs that work to inactivate β-lactamase (Walsh 2000).

Conclusion

It is extremely unlikely that the ampicillin resistance gene will transfer from high oleic acid soybeans to bacteria in the human digestive tract because of the number and complexity of steps that would need to take place consecutively. In the highly unlikely event that the ampicillin resistance gene was transferred to bacteria in the human digestive tract the human health impacts would be negligible because ampicillin resistant bacteria are already commonly found in the human gut and in the environment and ampicillin is rarely used clinically.

Characterization of novel protein

Biochemical function and phenotypic effects

δ-12 desaturase

The synthesis of polyunsaturated fatty acids in developing oilseeds is catalysed by two membrane-associated desaturases that sequentially add a second and third double bond to oleic acid (Kinney, 1994). The pathway for the synthesis of long chain fatty acids in plants is depicted in the introductory chapter.

The second double bond, converting oleic acid to linoleic acid, is added at the δ-12 (n-6) position by a δ-12 desaturase, encoded by the *GmFad 2-1* gene (Okuley *et al.*, 1994, Heppard *et al.*, 1996). The third double bond, converting linoleic acid to linolenic acid, is added at the n-3 (δ-15) position by an n-3 desaturase, encoded by the *GmFad 3* gene (Yadav *et al.*, 1993). The *GmFad 2-1* gene used to genetically modify the soybeans is itself derived from soybean.

Dihydrodipicolinic acid synthase

Dihydrodipicolinic acid synthase (DHDPS) is responsible for catalysing the first step in the metabolic pathway for the synthesis of the essential amino acid lysine (Brock *et al.*, 1984). DHDPS catalyses the condensation of

aspartate semi-aldehyde with pyruvate to form 2,3-dihydrodipicolinate. The reaction takes place in the chloroplast of higher plants as well as in many bacteria. In plants, DHDPS is inhibited by lysine and is the major regulatory enzyme of lysine biosynthesis. Animals are incapable of synthesising lysine; therefore they must obtain their lysine through dietary sources.

β-glucuronidase

The *uidA* gene from *E. coli* encodes the enzyme β-glucuronidase (β-D-glucuronoside glucuronosohydrolase, EC 3.2.1.31), which is an acid hydrolase that catalyses the cleavage of a wide variety of β-glucuronides. Many glucuronide substrates can be used for spectrophotometric, fluorometric and histochemical analyses. Very little, if any, β-glucuronidase activity has been detected in higher plants (Jefferson *et al.*, 1986), therefore fusions of the *uidA* gene to plant genes or promoters can be used as a visual marker of plant transformation. In the case of plants that have been transformed with the *uidA* gene, the colourimetric substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronide is used as an indicator of β-glucuronidase activity.

β-lactamase

The bacterial *bla* gene codes for the enzyme β-lactamase and confers resistance to some β-lactam antibiotics, such as penicillin and ampicillin. The gene is used as a marker to select transformed bacteria from non-transformed bacteria during the DNA cloning and recombination steps undertaken in the laboratory prior to transformation of the plant cells. Only those bacterial cells that express the β-lactamase will grow in the presence of antibiotic. As the *bla* gene is under the control of a bacterial promoter it would not be expected to be expressed in transformed plant cells.

Protein expression analyses

δ-12 desaturase

Northern blot analysis, using the *GmFad 2-1* gene as a probe, was done on RNA isolated from developing R4 seeds of the high oleic acid soybeans at the time when the endogenous *GmFad 2-1* would normally be expressed (Figure 7). The δ-conglycinin promoter, linked to the transferred copy of the *GmFad 2-1* gene, is also active during this period. The data shows that seeds containing *GmFad 2-1 locus A* (G94-1, G168) do not have any detectable *GmFad 2-1* mRNA, whereas, seeds that contain the *GmFad 2-1 locus B* (G175) or seeds that only contain the endogenous *GmFad 2-1* gene (G90) have significant levels of mRNA. This demonstrates that neither of the *GmFad 2-1* genes is transcribed in the high oleic acid soybeans.

Dihydrodipicolinic acid synthase

Northern blot analysis, using the dapA probe, was done on RNA isolated from R6 leaves and R4 immature seeds of the high oleic acid soybeans (Figure 8). The data show that there is no detectable expression of dapA

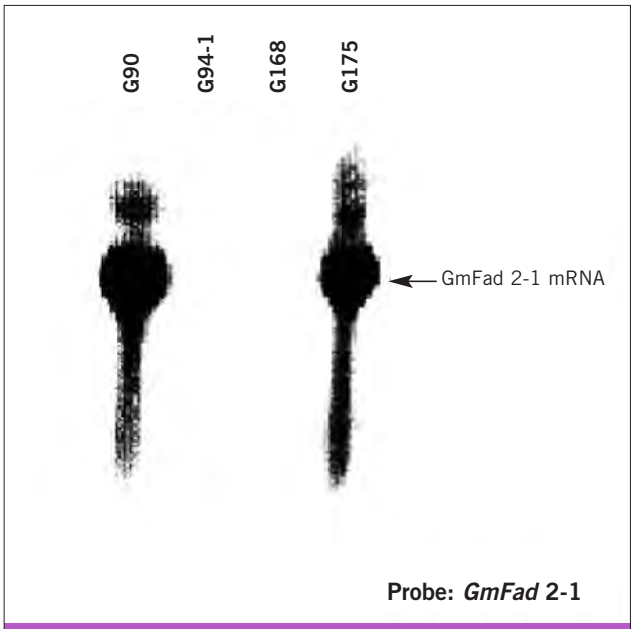


Figure 7. GmFad 2-1 Northern blot analysis on RNA isolated from developing R4 seeds at 20 days after flowering. G90 contains only the endogenous GmFad 2-1 gene and was used as a wild-type control. G94-1 and G168 contain the *GmFad 2-1 locus A* and G175 contains the *GmFad 2-1 locus B*.

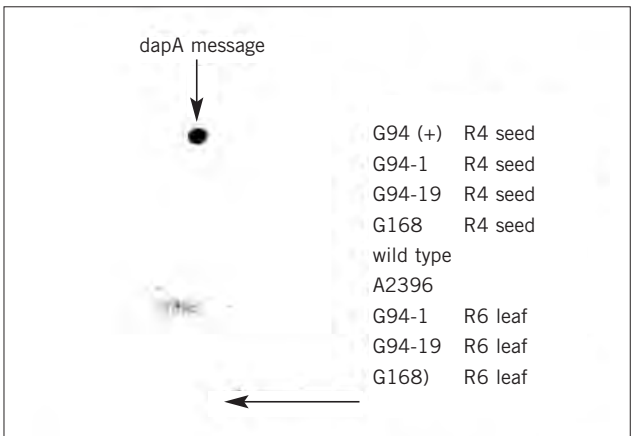


Figure 8. Northern blot analysis of high oleic soybeans. The blot was probed with the dapA coding region. Seed G94 contained the dapA gene and was used as a positive control. Two negative controls were used and labelled as wild type and A2396. The top of the gel is to the right and the bottom is to the left.

mRNA in sub-lines G94-1, G94-19 and G168. Western blot analysis, using a polyclonal anti-Corynebacterium DHDPS antibody, was done on total protein isolated from leaves and seeds of the three sub-lines. The data show that DHDPS protein can only be detected in seeds of the high lysine positive control line and not in any of the high oleic acid sub-lines under consideration.

Amino acid analyses were done on three replicates of each of the high oleic acid soybean sub-lines. These show that there are no differences in the lysine levels of the high oleic acid soybeans when compared to the parental soybean line (A2396).

β-glucuronidase

An intact *uidA* expression cassette is present in sub lines G94-1, G94-19 and G168, however, colourimetric analyses of R6 seeds and leaves from these lines show that the *uidA* gene is not expressed (Figure 9). The original transformant, line 260-05, was selected on the basis of its GUS expression therefore the *uidA* gene has become 'switched off' in subsequent generations. The applicant has not speculated as to the reason for the inactivation of the *uidA* gene, however, the inactivation of transgenes is relatively common in plants (Kilby *et al.*, 1992, Ingelbrecht *et al.*, 1994, Brusslan and Tobin, 1995).

β-lactamase

All of the lines derived from event 260-05, which contain only *GmFad 2-1 locus A*, also contain two intact copies of the *bla* gene. These two copies are under the control of a bacterial promoter and, therefore, should not be expressed in the plant cell. To confirm this, the activity of β-lactamase was measured in cell free extracts of leaf tissue from sub-line G94-1. The results of this study, which show that there is no detectable β-lactamase activity in sub-line G94-1, confirm that the *bla* gene is not expressed in plant cells (Figure 10).

Assessment of possible toxicity

If the GM food differs from its traditional counterpart by the presence of one or a few novel proteins, it is usually possible to assess the potential toxicity of these proteins in a manner analogous to traditional toxicity testing (WHO 2000). That is, the assessment is applied to the novel protein itself, rather than the whole food.

In considering the potential toxicity of a novel protein it is first important to determine whether it is likely to be present in the food as consumed, and thus whether exposure is likely[37]. Once likely human exposure to a novel protein is established, a number of different pieces of information can collectively be used to demonstrate there is a reasonable certainty that no harm will result from that exposure.

An assessment of potential toxicity of a novel protein should consider the following:

- Whether the novel protein has a prior history of safe human consumption, or is sufficiently similar to proteins that have been safely consumed in food;

[37] Even if it can be demonstrated that a protein will not be present in the edible portion, proteins known to be toxic to humans should never be deliberately introduced into another organism to be used for food because of the risk of accidental carryover into the edible portion.

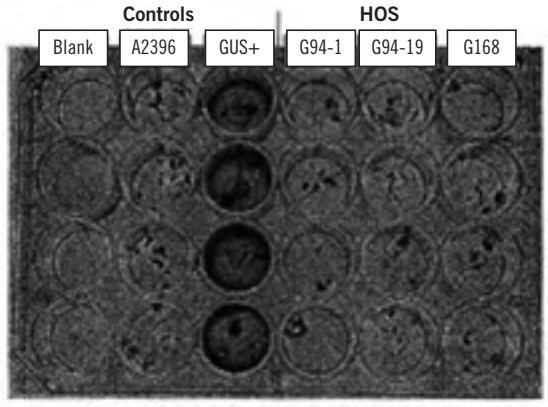
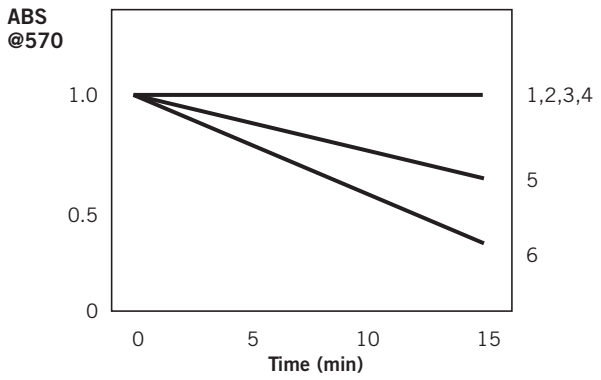


Figure 9. Colorimeteric GUS enzyme assay analysis on R6 seeds of high oleic acid soybean sub-lines G94-1, G94-19 and G168 and positive and negative (A2396) control lines. The positive control is a well-characterised GUS positive soybean line from a different transformation event. The dark colour of the solution in the wells indicates GUS enzyme activity.



1 = 50 µg BSA; 2 = 500µg A2396; 3 = 500µg G94-1;
4 = 2500 µg G94-1; 5 = 50 µg *E. coli*; 6 = 100 µg *E. coli*

Figure 10. b-lactamase activity in high oleic soybeans, elite control A2396 soybeans and in *E. coli* transformed with pBS43.

- Whether there is any amino acid sequence similarity between the novel protein and known protein toxins and anti-nutrients;
- Whether the novel protein causes any adverse effects in acute oral toxicity testing;
- Whether the novel protein is resistant to heat and/or processing;
- Whether the novel protein is resistant to degradation in simulated digestion models.

It should be noted that, unlike many other substances that are added to foods, the majority of proteins have a predictable metabolic fate in the digestive system, that is, they are typically broken down into their constituent amino acids and then assimilated. For novel proteins, it is therefore important to establish that they will behave like any other dietary protein. One method that can be used to demonstrate this is an in vitro digestibility assay. This assay should be able to establish if a novel protein has any characteristics unusual in dietary protein, such as resistance to digestive fluids.

Acute oral toxicity testing is an important component of the safety assessment of novel proteins and is particularly useful in circumstances where there is no prior history of safe consumption of the protein. Acute tests should be sufficient since - if toxic - proteins are known to act via acute mechanisms and laboratory animals have been shown to exhibit acute toxic effects from exposure to proteins known to be toxic to humans (Sjoblad *et al.*, 1992). The acute toxicity tests are done using purified protein that is administered at very high dose levels, usually orders of magnitude above what the human exposure level would be. Ideally, the protein to be tested should be that which has been directly purified from the new organism. Where this is not possible, usually because it is difficult to obtain sufficient quantities of purified protein, it is essential to ensure that the protein tested is biochemically and functionally equivalent to that present in the GM food.

If a novel protein is found to have no significant sequence similarities to known protein toxins, is not stable to heat and/or processing and is readily digested in conditions that mimic mammalian digestion and either has a prior history of safe human consumption and/or does not cause any toxic effects in acute toxicity testing then it can be reasonably concluded that the protein is non-toxic to humans and no further toxicological investigations would be required.

If a novel protein fails one or more of the criteria discussed above then further investigation of the novel protein may be required. For example, if adverse effects were noted in acute toxicity testing then additional toxicity testing would be required to determine a safe level of human exposure.

As part of the assessment of the potential toxicity of a novel protein it is important to also determine if the activity of the novel protein in the organism is likely to produce any secondary effects, such as the accumulation of other substances. If other substances are found to accumulate as a result of the activity of a novel protein, *e.g.*, the accumulation of a metabolite as a result of the detoxification of a herbicide in a plant, it is important to also include an assessment of the potential toxicity of such substances.

Assessment of possible allergenicity

Virtually all food allergens are proteins, but only a small fraction of the many proteins found in food are allergenic. Therefore, even though foods can contain tens of thousands of different proteins, relatively few are allergenic. As the use of recombinant-DNA techniques can result in additional protein diversity being added to the food supply, the potential allergenicity of any new protein should be a part of the safety assessment. It should be noted however that additional protein diversity could also be introduced into the food supply through conventional breeding techniques.

The prediction of the allergenic potential of a novel protein is not a simple matter and there are presently no validated animal models for the assessment of allergenicity. Because of this, the potential for a novel protein to be allergenic must be evaluated using an integrated, step-wise, case-by-case approach relying on various criteria used in combination, since no single criterion is sufficiently predictive of either allergenicity or non-allergenicity.

The assessment focuses on the source of the novel protein, any significant amino acid similarity between the novel protein and that of known allergens, and the structural properties of the novel protein, including susceptibility to digestion. Applying such criteria systematically provides reasonable evidence about the potential of a novel protein to act as an allergen (Lehrer and Reese 1998; Jones and Maryanski 1991).

The source of the novel protein and its amino acid sequence similarity to known allergens are key considerations in the allergenicity assessment. If the novel protein comes from a source known to be allergenic or has sequence similarity to a known allergen, further immunological testing, using sera from

individuals with a clinically validated allergy to the source of the protein, can be used to determine if the novel protein is likely to illicit an allergic response in affected individuals. A negative result may necessitate additional testing, such as skin tests in appropriate subjects.

Resistance to digestion has been observed in several food allergens, therefore such information will also be useful in making an overall determination about the potential for a novel protein to be allergenic to humans. The ability of food allergens to reach and cross the intestinal mucosal barrier in immunologically intact form appears to be a prerequisite to allergenicity (Metcalfe *et al.*, 1996). Simulated gastric and intestinal digestive models of mammalian digestion are typically used to assess the digestive stability of proteins (Astwood *et al.*, 1996).

As with potential toxicity, exposure to the novel protein is also an important consideration, which will contribute to an overall conclusion about the potential for a novel protein to be allergenic to humans. In this regard, the nature of the food product intended for consumption should be taken into consideration in determining the types of food processing which would be applied and its effects on the presence of the protein in the final food product. A classic example where this is relevant is in the case of refined oils, which typically do not contain any detectable protein.

Compositional analyses of key components, evaluation of metabolites, food processing and nutritional modification

A comparative approach, focussing on the determination of similarities and differences between the GM food and its conventional counterpart, aids in the identification of potential safety and nutritional issues and is considered the most appropriate strategy for the safety and nutritional assessment of GM foods (WHO 2000). The compositional analysis, where the key nutrients, key toxicants and anti-nutrients are measured in the GM food, is an important part of the comparative assessment. The key nutrients and toxicants/anti-nutrients are those components in a particular food that may have a substantial impact in the overall diet. These may be major constituents (*e.g.*, fats, proteins, carbohydrates) or minor components (*e.g.*, minerals, vitamins). Key toxicants are those toxicologically significant compounds known to be inherently present in the plant, such as those compounds whose toxic potency and level may be significant to health (*e.g.*, solanine in potatoes if the level is increased). The key components of soybeans that should be considered in the comparison include protein, fat, carbohydrates, amino acids, fatty acids, phytic acid, trypsin inhibitors, lectins and isoflavones (OECD 2001). The composition of the high oleic acid soybeans was compared to that of the elite soybean line from which they were derived (A2396).

Field studies and data collection

Two separate field studies of the high oleic acid soybeans were conducted. In the first study, lines G94-1 and G94-19 were grown at two locations in the United States: Slater, Iowa, and Isabella, Puerto Rico during the summer of 1995 and the Winter of 1995/1996. Seeds, representing the R4 and R5 generation, were analysed from each location. Values were obtained from duplicate assays on single samples from each of the four locations. Analyses were done of raffinose, stacchyose and phytic acid content as well as isoflavone content. In the second study conducted in the summer of 1996, lines G94-1, G94-19 and G168 were grown in parallel with the parental line A2396 at four locations in the United States: Redwood Falls, Minnesota, Kalamazoo, Michigan, Prairie City, Iowa and Cedar Rapids, Iowa. Seeds, representing the R6 generation, were analysed from each of the four locations. Values were obtained from duplicate assays on three replicates from each of the four locations. Analyses were done of proximate, trypsin inhibitor, amino acid, fatty acid, vitamin and mineral, and tocopherol content.

Key nutrients

Proximate analyses

Proximate analysis includes the measurement of crude fat/oil, protein, fibre, and ash content and is done to determine if there have been any changes to the major constituents of the soybean seed. The results of the proximate analysis are presented in Table 5.

The results show that there are no significant differences in proximate composition between the parental soybean line and the high oleic acid soybeans. The values obtained are also comparable to those reported in the literature for soybeans.

Amino acid composition

Amino acid content was determined for 17 out of the 20 amino acids. The three amino acids not analysed were

Table 5. Proximate content[1] of control and high oleic acid soybeans

	Parental control	*High oleic acid lines*	*Literature range*
	(g/100 g dry weight unless noted)		
Moisture (g/100 g fresh wt)	7.69 (7.00-8.20)	7.85 (7.20-8.40)	7-11
Crude fat/oil	25.37 (21.62-28.29)	23.90 (19.74-29.28)	13.2-22.5
Protein	40.11 (38.41-41.68)	40.76 (38.85-42.97)	36.9-46.4
Fibre	6.11 (5.44-7.14)	6.76 (5.00-7.26)	4.7-6.8
Ash	5.13 (4.53-5.85)	4.81 (4.13-5.54)	4.61-5.37

[1] *Mean values, the range in brackets.*

Table 6. Amino acid content[1] of parental and high oleic acid soybeans

Amino acid	*Parental control*	*High oleic acid lines*	*Literature range*
	(g/100 g dry weight)		
Tryptophan	0.44 (0.41-0.46)	0.47 (0.42-0.51)	0.53-0.54
Lysine	2.45 (2.27-2.63)	2.38 (2.17-2.67)	2.35-2.86
Histidine	0.96 (0.90-1.05)	0.93 (0.83-1.09)	0.89-1.08
Arginine	2.64 (2.42-2.91)	2.64 (2.37-2.88)	2.45-3.49
Aspartic acid	4.3 (3.98-4.58)	4.45 (4.14-4.93)	3.87-4.98
Threonine	1.37 (1.24-1.50)	1.52 (1.38-1.70)	1.33-1.79
Serine	1.79 (1.61-1.95)	1.84 (1.65-2.02)	1.81-2.32
Glutamic acid	7.13 (6.58-7.81)	7.03 (6.50-7.79)	6.10-8.72
Cysteine	0.55 (0.51-0.60)	0.58 (0.52-0.71)	0.56-0.66
Glycine	1.57 (1.44-1.68)	1.71 (1.56-1.85)	1.88-2.02
Alanine	1.54 (1.43-1.68)	1.67 (1.50-1.84)	1.49-1.87
Valine	1.73 (1.61-1.86)	1.84 (1.58-2.05)	1.52-2.24
Methionine	0.47 (0.44-0.50)	0.54 (0.47-0.60)	0.49-0.66
Isoleucine	1.72 (1.48-1.87)	1.76 (1.54-2.00)	1.46-2.12
Leucine	2.86 (2.64-3.05)	2.91 (2.70-3.18)	2.71-3.20
Tyrosine	1.45 (1.35-1.54)	1.51 (1.38-1.62)	1.12-1.62
Phenylalanine	1.82 (1.71-1.97)	1.86 (1.72-2.03)	1.70-2.08

[1] *Mean values, the range in brackets.*

proline, asparagine and glutamine. A summary of the results of the amino acid analysis appears in Table 6.

No significant differences were observed in amino acid content between the parental line and the high oleic acid soybeans for any of the 17 amino acids analysed. The values determined were comparable to the literature reported ranges.

Fatty acid composition

A complete fatty acid analysis of oil from the high oleic acid soybean lines G94-1 and G94-19 and control soybean lines grown in field trials in 1995/1996 was done and compared to the ranges specified by Codex Alimentarius for soybean oil. The results of the analysis are presented in Table 7.

A further, but more limited analysis of fatty acid content was done on all three high oleic acid soybean lines and the parental control soybean line grown in field trials in 1996. The results of the analysis are presented in Table 8.

The results from the two separate analyses demonstrate that the high oleic acid soybeans differ significantly from the parental soybean line in the levels of oleic, linoleic, linolenic and palmitic acid present in the oil. Oleic acid levels have been significantly increased and this has resulted in concomitant decreases in the levels of palmitic, linoleic and linolenic acids. The levels of other fatty acids present in the oil were similar between the parental and high oleic acid soybean lines and were comparable to the Codex

Table 7. Complete fatty acid analysis of control and high oleic acid soybean lines from 1995/96 field trials

Fatty acid	*Parental control*	*G94-1*	*G94-19*	*Codex range*
	(g/100 g fatty acid, mean values presented, ranges not provided)			
C14:0 myristic	<0.1	<0.1	<0.1	<0.5
C16:0 palmitic	10.1	6.3[1]	6.6	7.0-14.0
C16:1 palmitoleic	0.1	0.12	0.12	<0.5
C16:2 hexadienoic	<0.1	<0.1	<0.1	
C16:3 hexatrienoic	<0.1	<0.1	<0.1	
C18:0 stearic	3.2	3.7	3.6	1.4-5.5
C18:1 oleic	14.7	84.6	84.9	19.0-30.0
C18:2 (9,12) linoleic	61.6	0.9	0.6	44.0-62.0
C18:2 (9, 15) linoleic	<0.1	0.8	0.7	
C18:3 linolenic	9.5	2.4	1.9	4.0-11.0
C20:0 arachidic	0.2	0.4	0.5	<0.1
C20:1 eicosenoic	0.2	0.4	0.4	<0.1
C20:2 eicosadienoic	not done	not done	not done	
C22:0 behenic	0.3	0.4	0.5	<0.5
C22:1 erucic	<0.1	<0.1	<0.1	
C24:0 lignoceric	0.1	0.1	0.2	

[1] *Complete fatty acid analysis of control and high oleic acid soybean lines from 1995/96 field trials.*

Table 8. Fatty acid composition1 of oil from high oleic acid and control soybean lines from 1996 field trials

Fatty acid	*Parental control*	*High oleic acid lines*	*Literature range*
	(g/100 g fatty acid)		
C16:0 palmitic	10.25 (9.94-10.59)	6.55 (6.22-6.96)	7-12
C18:0 stearic	3.95 (3.57-4.27)	3.43 (3.04-3.81)	2-5.5
C18:1 oleic	23.09 (22.07-23.91)	83.84 (80.02-85.38)	20-50
C18:2 linoleic	55.36 (53.61-56.48)	2.23 (1.19-4.83)	35-60
C18:2 9,15 linoleic isomer	0.00	0.48 (0.37-0.56)	-
C18:3 linolenic	7.35 (6.81-8.35)	3.47 (2.87-4.51)	2-13

[1] *Mean values, the range in brackets.*

Alimentarius ranges for soybean oil. High levels of oleic acid are commonly consumed in other premium edible oils (*e.g.*, olive oil, high oleic acid sunflower and canola oils). The increased oleic acid levels do not pose a safety concern.

In addition to the expected changes to the fatty acid composition of oil from the high oleic acid soybean lines, a trace amount (less than 1% of the total fatty acid content) of the 9,15 isomer of linoleic acid (cis-9, cis-15-octadecadeinoic acid), normally found only in hydrogenated soybean oils and butterfat, was also detected. This isomer is not present in the oil of the parental soybean line A2396.

The applicant speculates that the presence of the isomer is the result of activity of a δ-15 (n-3) desaturase (GmFad3), which normally inserts a δ-15 double bond into 9,12-linoleic acid. In the transgenic plants, the linoleic acid content is reduced from >50% of the total fatty acids to <2% and therefore they speculate that the GmFad3 enzyme probably creates a small amount of the isomer by putting a δ-15 double bond into 9-oleic acid. The applicant provided data to support this hypothesis where the high oleic acid soybeans were crossed with a soybean containing a suppressed *GmFad3* gene. In the resulting progeny, the isomer is either reduced or virtually eliminated.

The applicant provided data on the occurrence of the 9,15 isomer of linoleic acid in commonly used oils and fats for frying and baking in Europe. This data is presented in Table 9.

Table 9. Occurrence of the 9,15 linoleic acid isomer in commonly used oils and fats for frying and baking

Oil/fat	*Fatty acid composition (g/ 100 g fatty acid)*					
	C16:0	*C18:0*	*C18:1*	*C18:2*	*C18:2 (9,15)*	*C18:3*
Palm olein, partially hydrogenated	20.8	4.0	48.3	22.4	1.3	0.8
Soybean oil, partially hydrogenated	10.8	5.8	44.8	21.4	3.4	0.7
Rapeseed oil, partially hydrogenated	5.6	3.8	72.0	8.9	2.7	1.3
Butter fat	34.8	11.7	26.6	2.6	0.4	0.8

Table 10. Vitamin and mineral content[1] of the control and high oleic acid soybeans

Vitamin or mineral[2]	*Parental control*	*High oleic acid lines*	*Literature range*
	(mg/100 g dry weight unless noted)		
Minerals			
Calcium	264 (245-302)	232 (212-251)	132.7-326.3
Copper	0.64 (0.30-1.00)	0.67 (0.24-1.02)	0.9-5.1
Iron	5.6 (4.2-7.4)	5.8 (3.8-7.9)	3.2-7.9
Magnesium	247 (232-260)	236 (215-261)	
Manganese	2.9 (1.9-4.0)	2.7 (2.2-3.6)	0.4-6.8
Phosphorous	621 (516-742)	636 (501-771)	378-1836
Potassium	1755 (1468-1950)	1689 (1492-1896)	859-1784
Sodium	3.1 (1.1-6.5)	4.3 (2.2-8.7)	
Zinc	4.0 (3.2-4.7)	4.3 (3.0-5.8)	
Vitamins			
Vitamin B6	0.115 (0.098-0.131)	0.125 (0.110-0.141)	
ß-carotene (IU/100 g dry wt)	8 (5-12)	10 (5-16)	
Vitamin B1	0.96 (0.74-1.17)	0.89 (0.63-1.24)	
Vitamin B2	0.29 (0.26-0.30)	0.30 (0.27-0.35)	
Vitamin E (IU/100 g dry wt)	1.2 (1.1-1.6)	1.1 (0.9-1.7)	
Niacin	2.6 (2.28-2.88)	2.74 (2.38-3.15)	
Pantothenic acid	1.051 (0.936-1.132)	0.961 (0.794-1.063)	
Folic acid (°g/100 g dry wt)	274 (184-379)	284 (186-384)	
Tocopherols			
Total	20.11 (18.01-22.50)	18.57 (16.36-21.16)	
Alpha	1.37 (1.11-1.62)	1.32 (1.06-1.62)	1.09-2.84
Beta	0.17 (0.07-0.20)	0.22 (0.15-0.30)	<0.5
Gamma	16.17 (14.03-18.81)	15.42 (13.12-17.58)	15.0-19.1
Delta	1.72 (1.52-2.11)	1.88 (1.61-2.28)	2.46-7.25

[1] *Mean values, the range in brackets.*

[2] *All samples contained less than 0.1 µg/100 g vitamin B12, less than 1.0 mg/100 g vitamin C and less than 5 IU/100 g retinol.*

This data shows that the 9,15 isomer of linoleic acid is commonly found in other edible sources of fat such as butterfat and partially hydrogenated vegetable oils at a range of 0.4-3.4% of the total fatty acids. Therefore, its occurrence in high oleic acid soybean oil at a level of 0.5% of the total fatty acids (representing about 25% of the linoleic acid fraction) is not considered to pose any safety concerns.

Vitamins and minerals

The high oleic acid soybean lines G94-1, G94-19 and G168 and the parental soybean line A2396 were analysed for their mineral and vitamin content including tocopherols. The tocopherols, also known as vitamin E, exist as four isomers (α-, β-, γ-, and δ-tocopherol). The four isomers are not equivalent, with α-tocopherol being the most important in terms of bioactivity. The

Table 11. Isoflavone content[1] of parental and high oleic acid acid soybean lines

Isoflavone	*Parental control*	*High oleic acid lines*	*Literature range*
	(µg/g dry weight)		
Total daidzein	693 (623-762)	612 (525-694)	295-1527
Total genistein	714 (574-854)	724 (548-910)	416-2676
Total glycitein	192 (188-196)	273 (261-287)	149-341

[1] *Mean values, range in brackets.*

Table 12. Lectin content[1] of parental and high oleic acid soybean lines

Lectin	*Parental control*	*High oleic acid lines*	*Literature range*
HU[1]/mg extracted protein	6.36 (4.09-7.90)	7.83 (5.37-9.70)	2.7-12.5
HU/mg total protein	2.98 (2.30-3.90)	3.67 (2.77-4.73)	1.2-6.0
HU/mg sample (FW basis)	1.03 (0.70-1.30)	1.32 (0.97-1.67)	0.5-2.4

[1] *HU = haemagglutinating unit, # mean values, the range in brackets.*

Recommended Daily Intake (RDI) for vitamin E is normally presented as α-tocopherol equivalents. The results of the vitamin and mineral analyses are summarised in Table 10.

No significant differences in mineral or vitamin content, including tocopherols, were observed between the high oleic acid soybeans and the parental soybean line. The mineral content of the high oleic acid soybeans was within the literature reported ranges. With the exception of the tocopherols, literature ranges for vitamin content was not provided. The delta tocopherol content was lower than the literature reported range for both the parental control and high oleic acid soybean lines. The content of the other tocopherols in the high oleic acid soybeans were within the literature reported ranges for soybeans.

Isoflavones

Soybeans naturally contain a number of isoflavone compounds reported to possess biochemical activity, including estrogenic and hypocholesterolemic effects, in mammalian species. Isoflavones (known to include phytoestrogens) have, in the past, also been regarded as anti-nutrients, however, this is no longer universally accepted as isoflavones have also been reported to have beneficial anti-carcinogenic effects. The major isoflavones in soybeans and soybean products include daidzin, genistin, and their corresponding aglycons, daidzein and genistein. Glycitin and glycitein also occur in trace amounts.

High oleic acid soybean lines G94-1 and G94-19 and parental soybean line A2396 were analysed for isoflavone content. The results are summarised in Table 11.

There are no significant differences between the parental soybean and the high oleic acid soybean lines G94-1 and G94-19 in either total daidzein or genistein content which is also within the literature reported ranges for soybeans. In relation to total glycitein content, however, the high oleic acid soybean lines exhibit slightly elevated levels compared to the control. The level reported for total glycitein however is within the literature reported range therefore this slightly elevated level compared to the control is not considered to pose any safety concerns.

Key toxicants

The only naturally occurring toxicants in soybeans are lectins. Lectins are proteins that bind to carbohydrate-containing molecules and which inhibit growth and sometimes cause death in animals. It is reasonable to assume that similar effects would occur in humans. Lectins, however, are rapidly degraded upon heating, and therefore only become an issue when raw soybeans are consumed. There are no human food uses for raw soybeans.

Notwithstanding that there are no human food uses for raw soybeans, the applicant undertook compositional analyses for lectin content of seeds from the high oleic acid soybean lines. The seeds represent the R6 generation of the high oleic acid soybean lines. Lines G94-1, G94-19 and G168 were grown in parallel with the parental line A2396 at four locations in the United States in the summer of 1996. To obtain the data,

Table 13. Anti-nutrient content[1] for parental and high oleic acid soybeans

Anti-nutrient	*Parental control*	*High oleic acid lines*	*Literature range*
Trypsin inhibitor (TIU/mg dry wt)	31.67 (22.84-40.47)	30.20 (14.21-42.43)	26.4-93.2
Phytic acid (g/100 g dry wt)	1.42 (1.32-1.53)	1.42 (1.25-1.69)	1.3-4.1

[1] *Mean values, the range in brackets.*

Table 14. Stacchyose and raffinose content[1] of parental and high oleic acid soybeans

Constituent	*Parental control*	*High oleic acid lines*	*Literature range*
	(µmoles/g dry weight)		
Stacchyose	63 (60-67)	68 (65-75)	44.8-68.8
Raffinose	14 (14-14)	15 (14-16)	8.6-18.5

[1] *Mean values, the range in brackets.*

three replicates were analysed in duplicate from each of the four locations. The results of these analyses are summarised in Table 12.

The high oleic acid soybean lines exhibit slightly elevated lectin levels when compared to the control. The values reported however are well within the literature reported range for soybeans. As lectins are readily degraded upon heating, and the levels reported are still within the literature reported range, the slightly elevated levels do not represent a safety concern.

Key anti-nutrients

Soybeans contain two well-described anti-nutritional factors. These are trypsin inhibitors and phytic acid. Trypsins inhibitors are heat labile anti-nutrients which interfere with the digestion of proteins and result in decreased animal growth. Because they are heat labile, however, they are destroyed during the processing of soy products by heat treatment. Phytic acid, on the other hand, remains stable through most soybean processing steps and has been implicated in interfering with the bioavailability of minerals such as calcium, magnesium and zinc.

Seed representing the R6 generation of lines G94-1, G94-19 and G168 were analysed for trypsin inhibitor and phytic acid content. The results are summarised in Table 13.

No significant differences were observed between the parental soybean line and the high oleic acid soybean lines for either of the anti-nutrients. The values reported are comparable to the literature reported ranges.

Other constituents

The fermentable galacto-oligosaccharides, raffinose and stacchyose, are present in soybeans and can be responsible for the production of unpleasant side effects, such as flatulence, when soybeans and soybean products are ingested. The processing of soybean flours into concentrates and isolates removes these oligosaccharides. Seeds representing the R4 and R5 generations of lines G94-1 and G94-19 were analysed for raffinose and stacchyose content. The results of the analyses are summarised in Table 14.

No significant differences were observed between the parental soybean line and the high oleic acid soybean lines for stacchyose and raffinose content. The values reported are comparable to the literature reported ranges.

Summary of the compositional analysis

The high oleic acid soybean lines exhibit slightly elevated lectin levels when compared to the control but these levels are well within the literature reported range for soybeans. As lectins are readily degraded upon heating and there are no human food uses for raw soybeans, the slightly elevated levels observed are not a cause for concern. No differences were seen in the levels of the anti-nutrients.

Analysis of the levels of various macro- and micronutrients confirmed that the high oleic acid soybeans are significantly changed with respect to their fatty acid profile. The mean oleic acid content has been increased from 23.1% in the parental soybean to 83.8% in the high oleic acid soybean lines and the linoleic acid content has been concomitantly decreased from a mean level of 55.4% to a mean level of 2.2%. Small reductions

in the levels of palmitic and linolenic acid were also observed. High oleic acid levels are found in other commonly consumed premium edible oils (*e.g.*, olive oil and high oleic acid sunflower and canola oil). The consumption of high levels of oleic acid is not considered to pose any safety concerns.

The compositional analyses revealed the unexpected occurrence of trace amounts (less than 1%) of an isomer of linoleic acid in the high oleic acid soybeans. This isomer is not present in the parental soybean line but is normally found in commonly consumed foods such as hydrogenated soybean oils and butterfat. It is present at levels in the high oleic acid soybeans that are comparable to the levels found in hydrogenated soybean oils and butterfat. Its presence is not considered to pose any toxicological or nutritional concerns.

In all other respects, the high oleic acid soybeans were found to be compositionally equivalent to the parental soybean line and other commercial varieties of soybeans.

Endogenous allergenic proteins

A separate part of the comparative analysis also considered the seed storage proteins of soybeans, which comprise a number of naturally occurring allergens. Although no new proteins are expressed in any of the high oleic acid soybean lines, they were found to exhibit a slightly altered seed storage protein profile and so a study was done to determine whether alterations to the protein profile of the high oleic acid soybeans had changed their allergenicity relative to the parental soybean line (A2396).

Soybean 7S and 11S globulins are two major storage proteins accounting for about 70% of total meal protein. The 7S fraction is made up of the α, α^1, and β subunits of β-conglycinin. The 11S fraction is made up of the acidic (A) and basic (B) subunits of glycinin. The high oleic acid soybeans were found to have reduced concentrations of the α and α^{-1} subunits of β-conglycinin, when compared with the parental A2396 soybean lines. This was coincident with an increase in the concentration of the A and B subunits of glycinin in addition to an increase in the concentration of the A2B1A glycinin precursor. The profile of other storage proteins appears to be identical to that of A2396.

The applicant speculates that the reduction in concentration of the β-conglycinin α and α^1 subunits is due to co-suppression by the α^1 promoter sequence used in the GmFad 2-1 vector (pBS43). The phenomenon of co-suppression has been observed for other genes and plants and is well documented in the literature (Brusslan and Tobin, 1995).

Radioallergosorbent (RAST) reactivity

Extracts were made of the parental soybean line A2396 and high oleic acid soybean line G94-1. Sera were used from 31 subjects with a history of documented soybean or food allergy, a positive skin test to soybean extract, and/or a positive IgE antibody response to soybean extract. Control sera were obtained from soybean tolerant individuals with a negative skin test and/or RAST to soy extract with total IgE levels similar to those sera of soybean-sensitive subjects.

In RAST reactivity assays many of the sera demonstrated significant IgE antibody reactivity to soybean extracts. Twenty-one of the 31 sera tested had IgE antibody % binding greater than or equal to 4 %. Eleven of the 21 positive sera had IgE antibody binding in excess of 20%. The sera with the most significant RAST reactivity were pooled for RAST inhibition studies.

RAST inhibition

Both the parental and high oleic acid soybean extracts yielded virtually identical RAST inhibition curves to the parental soybean RAST.

Immunoblot analysis

The 21 most potent RAST positive sera were selected for immunoblot analyses of soybean allergens. The immunoblot analysis showed, as expected, that there are a number of proteins in the soybean extract that bind IgE antibodies from soybean allergic sera. Some sera were more reactive than others, so six of the most reactive sera were selected and pooled for further study of the allergens present in the parental and high oleic acid soybeans. Both colourimetric and chemiluminescence techniques were used for the detection of reactive protein bands.

No significant differences were observed in the number of protein bands to which the sera react or to the intensity of the IgE reactivity.

Conclusion

The altered protein profile in the high oleic acid soybeans does not give rise to any significant differences in their allergen content compared to the parental soybean line A2396. Nor did the altered protein profile lead to significant changes to the total protein content of the high oleic acid soybeans.

Table 15. Effect of soybean meal varieties and processing temperature on pig F/G ratios

	Day 0 to7	*Day 7 to 14*	*Day 14 to 17*	*Day 0 to 17*
Commercial meal				
1.3% lysine	1.44	1.49	1.69	1.50
0.95% lysine	1.71	1.74	1.92	1.75
High oleic acid meal (0.95% lys)				
80-85 °C	2.38	2.42	3.56	2.49
85-90 °C	1.72	1.84	1.96	1.80
90-95 °C	1.84	1.74	1.83	1.78
100-105 °C	1.79	1.86	1.86	1.83
Check-line meal (0.95% lys)				
80-85 °C	1.75	1.86	2.03	1.84
85-90 °C	1.92	1.79	1.86	1.83
90-95 °C	1.82	1.82	1.87	1.81
100-105 °C	1.95	1.80	2.28	1.91

Nutritional impact

In assessing the safety and suitability of a GM food, a key factor is the need to establish that the food is nutritionally adequate and will support typical growth and well being. In most cases, this can be achieved through an understanding of the genetic modification and its consequences, together with an extensive compositional analysis of the food.

To date, all approved GM plants with modified agronomic production traits (*e.g.*, herbicide tolerance) have been shown to be compositionally equivalent to their conventional counterparts. Animal feeding studies with feeds derived from the approved GM plants have shown equivalent animal nutritional performance to that observed with the non-GM feed. Thus the evidence to date is that where GM varieties have been shown to be compositionally equivalent to conventional varieties, feeding studies using target livestock species will add little to a safety assessment and generally are not warranted (OECD 2003).

For plants engineered with the intention of significantly changing their composition or nutrient bioavailability and thus their nutritional characteristics, however, it is recognised that suitable comparators may not be available for a nutritional assessment based solely on compositional analysis. In such cases, feeding trials with one or more target species may be useful to demonstrate wholesomeness in the test animals.

In the case of the high oleic acid soybeans, significant compositional changes have been deliberately introduced into the food. The applicant therefore provided two animal feeding studies to compare the wholesomeness of the high oleic acid soybeans to controls and also undertook a study to estimate the human nutritional impact of high oleic acid soybean oil in the diet.

Animal feeding studies

Pig feeding study

This study was done to determine if soybean meal produced from high oleic acid soybeans would provide similar levels of growth performance in pigs as soybean meal from traditional varieties.

Three hundred and ninety (39/group) high-lean growth pigs (Newsham Hybrids) were fed diets consisting of processed soybean meal from either the high oleic acid soybean lines or a standard check-line soybean. The soybeans used to make the meal were processed at four different temperature ranges (80-85, 85-90, 90-95, 100-105 °C) under conditions that simulated commercial processing. Positive and negative control diets were made using commercially available soybean meal (46.5% crude protein). The positive control diet was formulated to contain dietary 1.3% lysine whereas the negative control diet was formulated to contain 0.95% dietary lysine. All test diets also contained 0.95% lysine so that any differences in growth performance could be readily attributable to the processing temperature or the amino acid availability. All pigs were fed a common 3 stage diet series until being placed on the test diets at 21 days post weaning. All test diets were corn-soybean meal based and were fed until 38 days post weaning.

Growth performance of the pigs is indicated by the average daily gain (ADG) as well as the F/G ratio, which

Table 16. Effects of processing temperature and soybean meal source on chick performance

	Daily gain 0-18 d (g)	*Feed intake 0-18 d (g)*	*Feed:gain 0-18 d (g)*	*Body weight 0-7 d (g)*	*Body weight 0-18 d (g)*
Raw					
Commercial	26.95	37.86	1.417	148.2	525.1
High oleic	15.35	30.25	1.953	101.8	316.3
Check-line	17.57	33.28	1.897	111.4	356.2
80-85 °C					
High oleic	23.60	36.66	1.570	129.6	464.8
Check-line	23.85	38.19	1.598	134.7	469.3
85-90 °C					
High oleic	24.96	38.83	1.558	136.5	489.3
Check-line	22.51	34.96	1.561	129.5	445.1
90-95 °C					
High oleic	25.71	39.53	1.540	1.45.4	502.7
Check-line	23.66	36.95	1.564	126.8	465.9
100-105 °C					
High oleic	24.03	39.07	1.628	135.0	472.5
Check-line	22.40	35.89	1.604	122.4	443.3

is a measure of the amount of the feed consumed (the average daily feed intake - ADFI) / ADG or, in other words, is an indication of how much food (in pounds) it takes to put on 1 lb of body weight in the animal. The F/G ratios obtained over the course of the study are provided in Table 15.

Pigs fed the positive control diet (commercially available soybean meal formulated to contain 1.3% dietary lysine) had increased performance (as measured by the ADG and the F/G ratio) than pigs fed any other treatment. This indicates that a dietary lysine content of 0.95% was insufficient to maximise growth performance of the pigs.

Pigs fed diets containing high oleic acid soybean meal were shown to have a similar growth performance compared to pigs fed diets containing either commercial soybean meal or meal derived from the check-line soybean formulated to similar lysine levels, when the high oleic acid soybean meal is processed at temperatures above 80-85 °C. The reason for the decreased performance, compared to the control, of pigs fed the high oleic acid soybeans processed at 80-85 °C is not readily apparent. The applicant speculates that the difference may be due to difficulties experienced with the processing of the soybeans in the pilot processing plant.

Chicken feeding study

This study was done to determine the effects of five different processing temperatures on the feeding value of the parental soybean line compared to the high oleic acid soybean lines.

Six hundred and sixteen (56/group) 1-day-old broiler chicks (Peterson x Arbor Acre) were randomly allotted to one of 11 dietary treatments. The chicks were fed diets consisting of soybean meal obtained from either a standard check-line soybean or the high oleic acid soybean lines and which had been processed at five different processing temperatures (raw, 80-85, 85-90, 90-95, and 100-105 °C). A positive control diet was included using commercially obtained high protein soybean meal. Test diets using the check-line soybean meal or the high oleic acid soybean meal were formulated to meet all nutrient requirements except for the amino acid concentration. The positive control diet contained 23% crude protein and 1.2% lysine, while diets containing check-line or high oleic acid soybean meal contained 20% crude protein and 1.03% lysine. Growth performance was measured by daily weight gain, the feed conversion ratio (feed:gain), and final body weight. The results are summarised in Table 16.

The results show that birds fed the 1.2% lysine diets (commercial soybean meal) performed significantly better in terms of their daily weight gain, feed conversion (feed:gain) and final body weight when compared to the test diets. This result is most likely attributable to the lower amino acid content of the test diets, although may also be due to differences in processing.

Table 17. The effect of replacing all oils and fats used in the domestic and commercial frying with high oleic acid soybean oil (values are means ± standard deviations)

% energy from	*High oleic acid soybean oil usage*		
	Current diet[1]	*Scenario I*	*Scenario II*
Saturated fatty acids	17.24 ± 3.44	16.61 ± 3.44	16.43 ± 3.43
Monounsaturated fatty acids	12.63 ± 2.15	14.97 ± 2.98	14.68 ± 2.86
n-3 polyunsaturated fatty acids	0.78 ± 0.27	0.73 ± 0.23	0.78 ± 0.23
n-6 polyunsaturated fatty acids	5.51 ± 2.15	3.89 ± 1.98	4.33 ± 1.92
Trans unsaturated fatty acids	2.24 ± 0.83	2.15 ± 0.83	2.12 ± 0.83

[1] *No high oleic acid soybean oil usage.*

No significant differences in performance, in either the daily weight gain or the feed conversion, between the parental soybean line and the high oleic acid soybean line were observed.

Conclusion

Interpretation of both feeding studies is complicated by the fact that they were designed to look at the effect of a number of different parameters, other than soybean variety, on feeding performance (*e.g.*, lysine content, processing temperature). Nevertheless, both demonstrate that the high oleic acid soybeans are equivalent to the commercial varieties of soybean in their ability to support typical growth and well-being in pigs and chickens.

Human nutritional impact

To assess the nutritional impact of high oleic acid soybean oil the applicant commissioned a study on the effect of high oleic acid soybean oil on the balance of dietary fats in the human diet using dietary and nutritional survey data for British adults.

The fatty acid composition of high oleic acid soybean oil was compared with those of commercial shortenings and frying oils sourced from Europe and the United States. The key findings of these comparisons were:

- The level of saturated fatty acids in high oleic acid soybean oil is similar to that in non-hydrogenated or lightly hydrogenated oils and is considerably lower than most European shortenings;
- Compared with frying oils with comparable levels of monounsaturated fatty acids, high oleic acid soybean oil has higher levels of n-6 polyunsaturated fatty acids (primarily linoleic acid);
- High oleic acid soybean oil is comparable with other frying oils for n-3 polyunsaturated fatty acids (primarily linolenic acid);
- High oleic acid soybean oil does not contain any of the trans isomers of unsaturated fatty acids found in many commercial shortenings.

For the dietary analysis two scenarios were modelled on the assumption that high oleic acid soybean oil replaced all oils present in savoury snacks, fried potatoes including chips and vegetables. It also assumed that frying oil accounted for 17% of the fat in all fried meat, eggs and fish. Because the composition of endogenous fat in the fried animal foods was not known, it had to be estimated for each food by difference between total fatty acids and a frying oil of known composition. In scenario I, a worst-case scenario, all the oil used for frying meat, eggs and fish was assumed to be a high n-6 polyunsaturated fatty acid (52.8%) corn oil. In scenario II, a more realistic scenario, the oil was assumed to be a palmolein/rapeseed (80:20) blend (12.3 % n-6 polyunsaturated fatty acids). Assumptions also had to be made about the level of n-6 polyunsaturated fatty acids in high oleic acid soybean oil as this level can be influenced by crop growth conditions. Commercially available high oleic acid soybean oil is anticipated to contain 2.2% n-6 polyunsaturated fatty acids but batches as low as 0.9% have been observed under certain field conditions. A n-6 polyunsaturated fatty acid content of 0.9% for high oleic acid soybean oil was assumed for scenario I and 2.2% was assumed for scenario II.

A summary of the main findings of the analysis is presented in Table 17.

The analysis shows that the impact of the high oleic acid soybean oil use on the intakes of saturated fatty acids is quite small, equivalent to a 5% reduction at best, with little difference between the two scenarios. The intake of monounsaturated fatty acids would increase at best by 19%, with again little difference between the two scenarios. The intake of n-6 polyunsaturated fatty acids would fall by 29% for scenario I and by 21% for scenario II. The analysis also

Table 18: A comparison of the effect of replacing all oils and fats used in frying and in the manufacture of savoury snacks with either high oleic acid soybean oil or olive oil (values are means)

Oil	*% energy from*				
	Scenario	*Mono*	*n-6 poly*	*n-3 poly*	*Saturated*
High oleic	I	15.7	3.2	0.8	16.6
Olive	I	15.6	3.3	0.7	16.7
High oleic	II	15.1	4.2	0.8	16.1
Olive	II	15.0	4.3	0.8	16.2
Current UK diet		**12.6**	**5.5**	**0.8**	**17.2**

Table 19. A comparison of mean percentage energy from fatty acids in British and Australian diets

Country	*Mean % Energy from fatty acid type*		
	Mono	*Poly*	*Saturated*
United Kingdom	12.6	6.3	17.2
Australia	11.8	5.0	12.7

shows that there would be little or no change to the intakes of n-3 polyunsaturated fatty acids or trans unsaturated fatty acids with either scenario.

To put the use of high oleic acid soybean oil into context, the analysis was repeated using a low n-6 olive oil (79.3% monounsaturated fatty acids, 0.7% n-3 polyunsaturated fatty acids and 6% n-6 polyunsaturated fatty acids) to replace all of the fats and oils considered in the analysis. The results of this analysis are presented in Table 18.

This analysis shows that, were low n-6 olive oil to replace all the fats considered in the analysis, the impact would be very similar to that of high oleic acid soybean oil under similar conditions.

The study concluded that while the use of high oleic acid soybean oil might lower dietary linoleic acid intake somewhat (by an absolute maximum of 29%), it would not do so to any level that would be a public health concern in terms of cardiovascular disease. Moreover, it was concluded that such a reduction could apply equally to many existing commercially available low n-6 polyunsaturated frying oils, such as olive oil.

Therefore, the overall finding of the study was that the nutritional impact of the use of high oleic acid soybean oil as a replacement for frying fats was likely to be beneficial because diets incorporating high oleic acid soybean oil show decreased saturated fatty acid intakes and this is likely to reduce risk factors for cardiovascular disease.

The general conclusion of this report were then applied to the Australian context and indicate that the magnitude of the changes is likely to be reduced. Table 19 shows a comparison of the fatty acid profiles of the United Kingdom and Australia from recent national dietary surveys.

The fall in mean polyunsaturated intakes quoted for the British case above assumes 100% replacement. In reality, this is unlikely to happen, and data given in the report show that, with successive reductions in the % replacement, intakes progressively increase towards original levels. For example at 25% percent replacement, percentage energy from PUFA decreases to 6.0%.

There are some high monounsaturated oils available or soon to be available on the Australian market that have been created through conventional plant breeding and selection techniques from sunflower and rapeseed stock. These types of oils have been successful in replacing a proportion of palm oil mixes in food manufacture and retail frying. Olive oil has also become a popular oil for domestic use.

Conclusions

The information summarised in this case study was used for safety assessment in Australia and New Zealand.

FSANZ stated the following as a summary of their evaluation of the high oleic acid soybeans:

Three lines of a new variety of soybean (G94-1, G94-19 and G168), high in the monounsaturated fatty acid oleic acid, were generated by the transfer of a second copy of a soybean fatty acid desaturase gene (GmFad 2-1) to a high yielding commercial variety of

soybean (line A2396). The fatty acid desaturase is responsible for the synthesis of linoleic acid, which is the major polyunsaturated fatty acid present in soybean oil. The presence of a second copy of the fatty acid desaturase gene causes a phenomenon known as "gene silencing" which results in both copies of the fatty acid desaturase gene being "switched off", thus preventing linoleic acid from being synthesised and leading to the accumulation of oleic acid in the developing soybean seed.

Soybeans are grown as a commercial crop in over 35 countries worldwide and have a long history of safe use as human food. The major food product to be derived from the high oleic acid soybeans will be the oil. High oleic acid soybean oil will be predominantly used in spraying and frying applications and might replace heat stable fats and oils such as hydrogenated soybean and rapeseed oil or palm olein/vegetable oil blends.

Other genes transferred along with the GmFad 2-1 gene were the uidA gene and the bla gene. The uidA gene is a colourimetric marker used for selection of transformed plant lines during the soybean transformation procedure. It codes for the enzyme β-glucuronidase and is derived from the bacterium *Escherichia coli*. The bla gene is a marker used to select transformed bacteria from non-transformed bacteria during the DNA cloning and recombination steps undertaken in the laboratory prior to transformation of the plant cells. It codes for the enzyme β-lactamase and confers resistance to some β-lactam antibiotics, such as penicillin and ampicillin. The use of the bla gene as a selectable marker was not considered to pose any safety concerns.

The transferred genes were all found to be stably integrated into the genome of the high oleic acid soybean lines and are all phenotypically and genetically stable over multiple generations and in various environments.

Extensive analyses of the high oleic acid soybeans demonstrated that none of the transferred genes give rise to a protein product, meaning no new proteins are expressed in any of the high oleic acid soybean lines.

The composition of the high oleic acid soybeans was compared to that of the elite soybean line from which they were derived. These comparisons examined the key nutrients, toxicants and anti-nutrients of soybeans, as well as the protein profile.

Soybeans contain the toxicant lectin as well as the anti-nutrients trypsin inhibitor and phytate. The high oleic acid soybean lines exhibit slightly elevated lectin levels when compared to the control but these levels are well within the literature reported range for soybeans. As lectins are readily degraded upon heating and there are no human food uses for raw soybeans, the slightly elevated levels observed are not a cause for concern. No differences were seen in the levels of the anti-nutrients.

Comparisons were also made with the levels of various macro- and micronutrients. Proximate (crude fat/protein, fibre, ash), amino acid, fatty acid, vitamin and mineral, and isoflavone levels were measured. These analyses confirmed that the high oleic acid soybeans are significantly changed with respect to their fatty acid profile. The mean oleic acid content has been increased from 23.1% in the parental soybean to 83.8% in the high oleic acid soybean lines and the linoleic acid content has been concomitantly decreased from a mean level of 55.4% to a mean level of 2.2%. Small reductions in the levels of palmitic and linolenic acid were also observed. High oleic acid levels are found in other commonly consumed premium edible oils (*e.g.*, olive oil and high oleic acid sunflower and canola oil). The consumption of high levels of oleic acid is not considered to pose any safety concerns.

The compositional analyses revealed the unexpected occurrence of trace amounts (less than 1%) of an isomer of linoleic acid in the high oleic acid soybeans. This isomer is not present in the parental soybean line but is normally found in commonly consumed foods such as hydrogenated soybean oils and butterfat. It is present at levels in the high oleic acid soybeans that are comparable to the levels found in hydrogenated soybean oils and butterfat. Its presence is not considered to pose any toxicological or nutritional concerns.

The seed storage proteins of soybeans, which comprise a number of naturally occurring allergens were also compared. Although no new proteins are expressed in any of the high oleic acid soybean lines, they were found to exhibit a slightly altered seed storage protein profile. Allergenicity testing confirmed, however, that the altered protein profile does not give rise to any significant differences between the allergen content of the high oleic acid soybeans and the parental soybean line A2396. Nor did the altered protein profile lead to significant changes to the total protein content of the high oleic acid soybeans.

In all other respects, the high oleic acid soybeans were found to be compositionally equivalent to the parental soybean line and other commercial varieties of soybean.

Two animal feeding studies, with pigs and chickens, were done with the high oleic acid soybeans.

These studies confirmed that the high oleic acid soybeans are equivalent to other commercial varieties of soybean with respect to its ability to support typical growth and well-being.

A study was also undertaken to assess the human nutritional impact of the use of high oleic acid soybean oil as a replacement for frying fats. The study concluded that the use of high oleic acid soybean oil might lower dietary linoleic acid intake somewhat (by an absolute maximum of 29%), but it would not do so to any level that would be a public health concern in terms of cardiovascular disease. Overall, the conclusion of the study was that the nutritional impact of the use of high oleic acid soybean oil was likely to be beneficial because diets incorporating high oleic acid soybean oil show decreased saturated fatty acid intakes and this is likely to reduce risk factors for cardiovascular disease.

Overall it was concluded that the high oleic acid soybeans are significantly changed with respect to their fatty acid profile but are comparable to non-GM soybeans in terms of their safety and nutritional adequacy.

On the basis of this safety assessment, food from high oleic soybean lines G94-1, G94-19 and G168 was approved in Australia and New Zealand in November 2000.

References

Astwood, J.D., Leach, J.N. and Fuchs, R.L. (1996). Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotechnology* 14: 1269-1273.

Barker, S.J., Harada, J.J. and Goldberg, R.B. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci.* (USA) 85: 458-462.

Berry-Lowe, S.L., McKnight, T.D., Shah, D.M. and Meagher, R.B. (1982). *J. Mol. Genet.* 1: 483-498.

Bevan, M., Barnes, W.M. and Chilton, M. (1983). Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Res.* 11: 369-385.

Bonnassie, S., Oreglia, J. and Sicard, A.M. (1990). Nucleotide sequence of the *dapA* gene from Corynebacterium glutamicum. *Nucleic Acids Res.* 18: 6421.

Brock, T.D., Smith, D.W. and Madigan, M.T. (1984). *The Biology of Microorganisms, 4th Edition*. Prentice Hall International Inc, New Jersey, 847 pp.

Brusslan, J.A., and Tobin, E.M. (1995). Isolation of new promoter-mediated co-suppressed lines in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molec. Biol.* 27: 809-813.

Calva, J.J, Sifuentes-Osbornio, J. and Ceron, C. (1996). Antimicrobial resistance in fecal flora: longitudinal community-based surveillance of children from urban Mexico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 1699-1701.

Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. and Goodman, H.M. (1982). Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J. Molec. Appl. Genet.* 1: 561-573.

Doyle, J.J., Schuler, M.A., Godette, W.D., Zenger, V., Beachy, R.N. and Slightom, J.L. (1986). The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolis vulgaris*. Structural homologies of genes and proteins. *J. Biol. Chem.* 261: 9228-9238.

Falco, S.C., Guida, T., Locke, M., Mauvais, J., Sanders, C., Ward, R.T., Weber, P. (1995). *Bio/Technology* 13: 577-582.

Harpster, M.H. *et al.* (1989). *Mol. Gen. Genet.* 212: 182-190.

Heppard, E.P., Kinney, A.J., Stecca, K.L., Miao, G-H (1996). Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal omega-6 desaturase genes in soybeans. *Plant Physiol.* 110: 311-319.

Ingelbrecht, I., Van Houdt, H., Van Montagu, M. and Depicker, A. (1994). Post-transciptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (USA) 91: 10502-10506.

Jefferson, R.A., Burgess, S.M., and Hirsh, D. (1986). β-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (USA) 83: 8447-8451.

Jofuku, D. and Goldberg, R.B. (1989). Kunitz trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the soybean life cycle and in transformed tobacco plants. *Plant Cell* 1: 1079-1093.

Jones, D.D. and Maryanski, J.H. (1991). Safety considerations in the evaluation of transgenic plants for human food. In: Levin MA and Strauss HS (eds) Risk assessment in genetic engineering. New York: McGraw-Hill.

Kilby, N.J., Ottoline Leyser, H.M. and Furner, I.J. (1992). Promoter methylation and progressive transgene inactivation in *Arabidopsis. Plant Mol. Biol.* 20: 103-112.

Kinney, A.J. (1994). *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 144-151.

Lehrer, S.B. and Reese, G. (1998). Food allergens: implications for biotechnology. In: Thomas JA (ed.) Biotechnology and safety assessment. Taylor and Francis, Philadelphia.

Metcalfe, D.D., Astwood, J.D., Townsend, R., Sampson, H.A., Taylor, S.L. and Fuchs, R.L. (1996). Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 36(S): S165-S186.

Neu, H.C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257: 1064-1073.

Odell, J.T., Nagy, F., and Chua, N-H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.

OECD (2001). *Consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean: key food and feed nutrients and anti-nutrients*. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, No. 2. Organisation of Economic Cooperation and Development, Paris.

OECD (2003). *Considerations for the safety assessment of animal feedstuffs derived from genetically modified plants*. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, No. 9. Organisation of Economic Cooperation and Development, Paris.

Okuley, J., Lightner, J., Feldman, K., Yadav, N., Lark, E. and Browse, J. (1994). *Arabidopsis* FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell* 6: 147-158.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.

Sjoblad, R.D., McClintock, J.T. and Engler, R. (1992) Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. *Regulatory Toxicol*. Pharmacol. 15: 3-9.

Voinnet, O. (2002) RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* 5:444-451

Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406: 775-781.

Wang, M. and Waterhouse, P.M. (2001) Application of gene silencing in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 5:146-150

WHO (1993) *Health aspects of marker genes in genetically modified plants*. Report of a WHO Workshop. World Health Organization, Geneva.

WHO (2000). *Safety aspects of genetically modified foods of plant origin*. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on foods derived from biotechnology. World Health Organization, Geneva.

Yadav, N.S., Wierzibicki, A., Aegerter, M., Caster, C.S., Perez-Grau, L., Kinney, A.J., Hitz, W.D. *et al.* (1993). Cloning of higher plant omega-3 fatty acid desaturases. *Plant Physiol.* 103: 467-476.

Yeh, P., Sicard, A.M. and Sinskey, A.J. (1988). *Mol. Gen. Genet.* 212: 105-111 ●

166 Description of the Recombinant-DNA Plant
168 Description of the Host Plant and its Use as Food
169 References
171 Description of the Donor Organism(s)
171 The Donor Genes
171 Potential Pathogenicity of the Donor Organism
171 References
172 Description of the Genetic Modification
172 Description of the Transformation Method
172 Plasmid PV-GMGT04
174 References
175 Characterization of the Genetic Modification
175 Characterization of the Primary Insert
179 Characterization of the Secondary Insert
182 Sequence of the 5' and 3' Ends of the Primary Insert
183 Summary
183 References
185 Conclusion
185 References
185 Expressed Material / Effect
187 References
188 Assessment of Possible Toxicity
188 Acute Mouse Gavage Study with CP4 EPSPS Protein
188 Digestion of CP4 EPSPS in Simulated Gastric and Intestinal Fluids
189 Lack of Homology of CP4 EPSPS Protein with Other Protein Toxins
189 Conclusion
189 References
190 Assessment of Possible Allergenicity
190 Immunoreactivity with Sera from Sensitized Individuals
190 Physiochemical Properties of CP4 EPSPS
190 Stability to *In vitro* Digestion
191 Amino Acid Sequence Analysis
191 Prevalence in Food
191 Conclusion
191 References

Etude de cas 3

Evaluation de la sécurité sanitaire du soja génétiquement modifié résistant aux herbicides

Food safety assessment of a genetically modified herbicide tolerant soybean

192 Compositional Analyses of Key Components, Evaluation of Metabolites, Food Processing and Nutritional Modification
192 Proximate Analysis
194 Amino Acid Composition
194 Fatty Acid Composition
195 Soybean Seed Proteins
195 Levels of Antinutrients
196 Trypsin Inhibitors
196 Lectin Analysis
197 Isoflavone Analysis
197 Stachyose, Raffinose, and Phytate Analysis of Soybean Meal
198 Nutrient Bioavailability – Confirmatory Animal Feeding Studies
200 References

Preface

This teaching module has been developed as a tool for providing regulators with practical training in GM food safety assessment. The specific safety assessment approach discussed in this text is based on the Canadian regulatory framework for biotechnology products and on Health Canada policy. Nonetheless, the concepts are consistent with those described in international consensus documents produced by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), the World Health Organization (WHO) and the Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations.

In order to provide some insight into the type of data usually presented in support of a GM food evaluation, a case study of genetically engineered soybean (Glycine max) event GTS 40-3-2 and its progeny has been developed. The content of the study includes excerpts from applications for food safety assessment submitted to regulatory authorities in Canada, the United Kingdom (UK), and the United States (US).

A note on quality standards for documentation

The evaluation of an application for a GM food safety assessment is comparable to the peer review of a manuscript for publication in a scientific journal. Accordingly, the quality of the text and data presented must be commensurate with this. Experimental procedures should be described in sufficient detail (or referenced accordingly) so that the methodology can be repeated. Spelling and usage should be standard and laboratory jargon avoided. It is recommended that international standards for nomenclature be adopted, such as those described in the International Union of Biochemistry and Molecular Biology's Biochemical Nomenclature and Related Documents [(1992) 2nd Ed. Portland Press, Inc., Chapel Hill, NC], which contains the International Union of Biochemistry rules of nomenclature for amino acids, peptides, nucleic acids, polynucleotides, vitamins, co-enzymes, quinones, folic acid and related compounds, corrinoids, lipids, enzymes, proteins, cyclitols, steroids, carbohydrates, carotenoids, peptide hormones, and human immunoglobulins. Correct chemical names should be given and strains of organisms should be specified. Trade names should be identified. Système International (SI) units and symbols should be used whenever possible.

Illustrations, tables and figures must be clear and legible. Original drawings, high-quality photographs or laser prints are acceptable; poor-quality reproductions that often result from photocopying prints are not. In particular, reproductions of gels or blots must be of sufficient quality to clearly show the described results.

Disclaimer

Monsanto Inc. has generously consented to the use of the information provided in various of their regulatory submissions for event GTS 40-3-2 as a training tool. It must be noted, however, that in order to enhance the utility of the case study as a training tool, liberties were taken with the information provided in the original applications. Certain information has been reduced to summaries and the data as presented in the case study are only a subset of that actually submitted. The case study in no way constitutes a complete application nor is it to be considered a complete safety assessment. To that end, the use of this information in the form of a training tool does not constitute an endorsement of the information or product nor should it be considered a reflection of any of the original submissions.

Description of the recombinant-DNA plant

Soybean is grown as a commercial crop in over 80 countries, with a combined harvest of 162 million metric tonnes. The major producers of soybeans in 2000 were the United States, Brazil, China, Argentina, India, Canada and Paraguay. Soybean is grown primarily for its seed, which has many uses in the food and industrial sectors, representing one of the major sources of edible vegetable oil and of proteins for livestock feed use.

A major food use of soybean in North America and Europe is as purified oil, used in margarines, shortenings, and cooking and salad oils. It is also a major ingredient in food products such as tofu, tempeh, soya sauce, simulated milk and meat products, and is a minor ingredient in many processed foods. Soybean meal is used as a supplement in feed rations for livestock.

Weeds are a major production problem in soybean cultivation. Typically, weeds are managed using a combination of cultural (*e.g.* seed bed preparation, using clean seed, variety selection, and planting date) and chemical controls. Depending on the production

area and the prevalent weed species, herbicides may be applied before planting (*e.g.* pendimethalin, trifluralin, metribuzin), after planting but before emergence (*e.g.* pendimethalin, linuron, imazethapyr), and/or after emergence (*e.g.* bentazon, acifluorfen, fomesafen). Commonly, several different herbicides are required to adequately control weeds in soybean fields.

The soybean line GTS 40-3-2 was developed to allow for the use of glyphosate, the active ingredient in the herbicide Roundup®, as a weed control option. This genetically engineered soybean line contains a form of the plant enzyme 5- enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) that allows GTS 40-3-2 to survive the otherwise lethal application of glyphosate. The EPSPS gene put into GTS 40-3-2 was isolated from a strain of the common soil bacterium *Agrobacterium tumefaciens* called CP4; the form of EPSPS enzyme produced by this gene is tolerant to glyphosate.

The EPSPS enzyme is part of an important biochemical pathway in plants called the shikimate pathway, which is involved in the production of aromatic amino acids and other aromatic compounds. When conventional plants are treated with glyphosate, the plants cannot produce the aromatic amino acids needed to grow and survive. EPSPS is present in all plants, bacteria, and fungi. It is not present in animals, which do not synthesize their own aromatic amino acids. As the aromatic amino acid biosynthetic pathway is not present in mammals, birds or aquatic life forms, glyphosate has little if any toxicity for these organisms. The EPSPS enzyme is naturally present in foods derived from plant and microbial sources.

GTS 40-3-2 was developed by introducing the CP4 EPSPS gene into a commercial soybean variety using particle-acceleration (biolistic) transformation. The glyphosate tolerance trait expressed in GTS 40-3-2 has since been transferred into more than one thousand commercial soybean varieties by traditional breeding techniques.

GTS 40-3-2 has been tested in field trials in the United States, Central and South America, Europe, and Canada since 1991. Data collected from over 150 field trials conducted over a three-year period prior to commercialization in the United States demonstrated that GTS 40-3-2 did not differ significantly from conventional soybeans in morphology, seed production (yield), agronomic characteristics (such as time to flowering and pod set, or vigor) and tendency to weediness. GTS 40-3-2 did not negatively affect beneficial or nontarget organisms, and was not expected to impact on threatened or endangered species.

Table 1. Regulatory approval status of glyphosate tolerant soybean event GTS-40-3-2

Country	*Environment (year)*	*Food and/or feed (year)*	*Marketing (year)*
Argentina	1996	1996	
Australia		2000	
Brazil	1998	1998	
Canada	1995	1996	
China		2004	
Czech Republic		2001	2001
European Union			1996
Japan	1996	1996	
Korea		2000	
Mexico	1998	1998	
Philippines		2003	
Russia		1999	1999
South Africa	2001	2001	
Switzerland		1996	
Taiwan		2002	
United Kingdom		1996	
United States	1994	1994	
Uruguay	1997	1997	

Soybean does not have any weedy relatives with which it can crossbreed in the continental United States or Canada. Cultivated soybean can naturally cross with the wild annual species G. *soja*, however G. *soja*, which occurs naturally in China, Korea, Japan, Taiwan and the former USSR, is not naturalized in North America. Additionally, soybean plants are almost completely self-pollinated and reproductive characteristics such as pollen production and viability were unchanged by the genetic modification resulting in GTS 40-3-2. It was therefore concluded that the potential for transfer of the glyphosate tolerance trait from the transgenic line to soybean relatives through gene flow (outcrossing) was negligible in managed ecosystems, and that there was no potential for transfer to wild species in Canada and the continental United States.

The food and livestock feed safety of GTS 40-3-2 soybean was established based on: the evaluation of the similarity of the structure and function of CP4 EPSPS protein to this same enzyme naturally present in foods and livestock feeds, the fact that CP4 EPSPS protein constitutes a small amount of the protein in GTS-40-3-2 soybeans so there is little dietary exposure, the lack of toxicity or allergenicity of EPSPS proteins from plants, bacteria and fungi, and by direct laboratory studies of the CP4 EPSPS protein. Comparative analyses of key nutrients, including proximates (*e.g.* protein, fat, fibre,

ash, and carbohydrates), as well as antinutrients between GTS 40-3-2 soybeans and conventional soybeans did not reveal any significant differrences. Feeding studies with rats, broiler chickens, cows, and fish further supported the safety and nutritional quality of GTS 40-3-2 as human food and livestock feed.

Event GTS 40-3-2 received its first regulatory approval in the US in 1994 (US Department of Agriculture), and has since been approved for environmental release and use in livestock feed and/or human food in 17 countries and the European Union (Table 1). In 1996, glyphosate tolerant soybeans were planted on less than 5% of the US soybean acreage. In the 2000 growing season, 54% of the soybeans – approximately 40 million acres of the 75.4 million acres of soybeans grown in the United States – were glyphosate tolerant. In Argentina, where the adoption rate is estimated at 95%, glyphosate tolerant soybeans were grown on over 20 million acres in 2000. Globally, glyphosate tolerant soybeans made up 58% of all transgenic crops grown in 2000.

Description of the host plant and its use as food

The genus *Glycine* Willd. is a member of the family Leguminosae, subfamily Papilionoideae, and the tribe Phaseoleae. The genus *Glycine* is of Asian and Australian origin (Lackey, 1981). *Glycine* is divided into two subgenera, *Glycine* and *Soja* (Moench) F. J. Herm. The subgenus *Glycine* consists of 12 wild perennial species (Hymowitz *et al.* 1991) with wide distribution patterns: Australia, South Pacific Islands, West Central Pacific Islands, China, Papua New Guinea, Philippines, and Taiwan (Hermann, 1962; Newell & Hymowitz, 1978; Hymotitz & Newell, 1981; Grant *et al.* 1984a, 1984b; Tindale 1984, 1986a, 1986b). The subgenus *Soja* includes the cultivated soybean, *G. max* (L.) Merrill, and its nearest wild relative, G. *soja* Sieb. and Zucc., that has been found in China, Taiwan, Japan, Korea, and the former USSR. Both of these species are annuals.

Soybean is a cultivated species of the legume family. Soybeans grow on erect, bushy annual plants, 0.3 - 1.2 metres high with hairy stems and trifoliate leaves. The flowers are small in axillary racemes, usually white or purple. The male and female floral organs are enclosed within the corolla. The seeds are produced in pods, usually containing three spherical to oval seeds weighing 0.1–0.2 g. More detailed descriptions of soybean morphology can be found in Hermann (1962) and Carlson & Lerston (1987).

Glycine is the only genus in the Phaseoleae where species have diploid chromosome numbers of 40 and 80 but not 20. The unique chromosome number of *Glycine* is probably derived from diploid ancestors with base number 11, which have undergone aneuploid loss to base number 10 (Lackey 1988). In the legumes, only 10 of 71 genera are considered completely polyploid, *Glycine* is one of these (Senn, 1938). The soybean should be regarded as a stable tetraploid with diploidized genomes (Gurley *et al.* 1979; Lee & Verrna 1984; Skorupska *et al.* 1989).

Soybean is native to China. Early Chinese history refers to soybeans in books written over 4500 years ago (Hymowitz & Singh 1987). Soybean is believed to have been domesticated in the eastern half of northern China around the 1lth century B.C. or earlier (Hymowitz 1970), and its cultivation subsequently extended throughout south-east Asia. Soybean is believed to have been introduced into Western Europe in the 18th century (Wolf 1983), though Europe today is a minor producer of soybean, producing less than 2% of the world's production (Oil World Annual 1992). Soybean was introduced into the USA in 1765 (Hymowitz & Harlan 1983), primarily as a forage crop grown for hay and silage. Successful use of soybean as an oilseed in Europe from 1900 to 1910 promoted interest in its use in the USA. Even though interest in soybean production was on the increase during the 1920s and 1930s, most soybean acres were used for forage. The first U.S cultivars selected from planned cross-pollinations were released in the 1940s. Cultivars selected from the first populations formed by hybridization were used as parents to form populations for additional cycles of selection. The process of utilizing superior progeny from one cycle of selection as parents to form populations for the next cycle continues up to the present time (Burton 1987).

In the United States, there has been a rapid expansion in the cultivation of soybean over the past fifty years. Soybean production regions in the USA are concentrated in the Midwest and in the Mississippi Valley (Hazera & Fryar 1981). Apart from the United States (59.8 million metric tons in 1992/93), the principle soybean production areas are now in Brazil (21.3 MT), Argentina (11.7 MT), the Peoples Republic of China (9.7 MT) and India (USDA 1993). The main soybean producing states in Brazil are Rio Grande Do Sul, Parana, and Mato Grosso. In Argentina, the main soybean growing areas are the provinces of Sante Fe, Buenos Aires, and Cordoba.

In Western Europe, soybean is grown mainly in Italy (0.2 -0.4 Mha), in France (0.05 -0.15 Mha), and

occasionally in Greece and Spain. French soybean production is located mainly in the south west and in the Loire valley. In Italy, the soybean production areas are located in the Po valley, particularly in the Po delta and on the coastline of the Veneto region. Europe is one of the major world importers of soybeans.

Soybean is known to contain a number of natural antinutritional components (Rackis 1974; Orthoefer 1978). Trypsin (protease) inhibitors are known to have antinutritive properties in animals fed unprocessed soybeans (Rackis 1974; Rackis *et al.* 1986), although adequate heating inactivates trypsin inhibitors. Soybean hemagglutinin is known to cause red blood cell agglutination *in vitro* (Leiner, 1953), but there is no clear evidence that soybean hemagglutinin plays an antinutritive role (Rackis 1974). The phytoestrogens genistein, daidzein and coumesterol, naturally present in soybeans, are reported to possess a number of biochemical activities in mammalian species, including estrogenic and hypocholesterolemic activities (Wang *et al.* 1990; Murphy 1982). The low molecular weight carbohydrates stachyose and raffinose are known to cause flatus activity (Rackis 1974). Phytic acid (phytate) may reduce mineral availability, since it exists in soybeans as an insoluble, non-nutritionally available calcium-magnesium-potassium complex (Orthoefer 1978; Mohamed *et al.* 1991).

Soybean is also known to be the cause of food allergies in certain individuals (Burks *et al.* 1988). Although the specific soybean proteins that elicit the allergenic reactions in soybean have not been uniquely identified or characterised, these proteins have typically been characterised by immunoblotting (Bush *et al.* 1988; Shibasaki *et al.* 1980). Using this technique, specific protein bands have been identified that react with the IgE antibody produced from a pool of sera from soybean sensitive individuals. The number of allergenic proteins varies with sera obtained from individuals in different countries, probably reflecting the extent of consumption of soybean products in the diet. Data from one study in the United States (Bush *et al.* 1988) showed 9 different allergenic proteins using the immunoblot technique, whereas a study in Japan using the same procedure (Shibasaki *et al.* 1980) concluded that there may be as many as 15 different allergenic proteins.

G. max L. cv. A5403 ("A5403"), the cultivar that was genetically modified to be tolerant to glyphosate, is a maturity group V cultivar which combines a consistently high yield potential with resistance to races 3 and 4 of the soybean cyst nematode (SCN). It has purple flowers, grey pubescence and tan pods. Seeds are dull yellow with imperfect black hila. A5403 also combines good standability, excellent emergence, and tolerance to many leaf and stem diseases. A5403 was one of the first group V cultivars with SCN resistance provided to farmers and has received protection under the United States Plant Variety Protection Act. The commercialization strategy for GTS 40-3-2 is to use traditional backcrossing and breeding to transfer the glyphosate tolerance locus from this cultivar to a wide range of varieties and maturity groups of soybeans.

Soybean has a history of safe use as food. Soybeans or processed fractions are consumed in many human food products or animal feeds; soybean is one of the world's largest sources of plant protein and oil. Consequently, the characteristics of soybean in general, and more specifically progenitor line A5403, do not warrant analytical or toxicological tests. Typically, soybean breeders make genetic crosses to generate new cultivars with enhanced commercial value, and they evaluate new varieties primarily based on yield, as well as protein and oil content.

References

Burton, J. W. (1987). Quantitative genetics: results relevant to soybean breeding, *Agronomy* 16: 211-247.

Burks, A.W., Brooks, J.R., Sampson, H.A. (1988). Allergenicity of major component proteins of soybean determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) & immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenge. *Journal of Allergies and Clinical Immunology* 81:1135-1142.

Bush, R.K., Schroeckenstein, D., Meier-Davis, S., Balmes, J., & Rempel, D. (1988). Soybean flour asthma: detection of allergens by immunoblotting. *Journal Allergy and Clinical Immunology* 82: 251-255.

Carlson, J. B. & Lersten, N. R. (1987). Reproductive morphology. *Agronomy* 16: 95-134.

Grant, J.E., Brown, A.H.D. & Grace J.P. (1984a). Cytological and isozyme diversity in Glycine tomentella Haryata (Legumonosae). *Australian Journal of Botany* 32: 665-677.

Grant, J.E., Grace, J.P., Brown, A.H.D. & Putievsky, E. (1984b). Interspecific hybridization in Glycine Willd. Subgenus Glycine (Legumonosae). *Australian Journal of Botany* 32: 655-663.

Gurley, W.B., Hepburn, & A.G., Key, J.L. (1979). Sequence organization of the soybean genome. *Biochem. Biophys. Acta* 561: 167-183.

Hazera, J. & Fryar, E. (1981). Regional soybean production since 1960 and the outlook for the 1980s. Economic Research Service USDA F05-305. U.S. Govt. Printing Office, Washington, D.C.

Hermann, F. J. (1962). A revision of the genus Glycine and its immediate allies. United States Department of Agriculture Technical Bulletin 1268: 1-79.

Hymowitz, T. (1970). On domestication of soybean. *Economic Botany* 24: 408-421.

Hymowitz, T. & Newell, C. A. (1981). Taxonomy of the genus Glycine, domestication and uses of soybeans. *Economic Botony* 35: 272-288.

Hymowitz, T. & Harlan, J. R. (1983). Introduction of soybeans to North America by Samuel Bowen in 1765. *Economic Botany* 37: 371-379.

Hymowitz, T. & Singh, R. J. (1987). Soybean Monograph, Soybeans: Improvement, Production, and Uses. (2nd ed.). Wilcox, R. J. ed., pp. 23-48.

Hymowitz, T., Palmer, R.G. & Singh, R.J. (1991). Cytogenetics of the genus Glycine. In Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution, Part B. Tsuchiya, T. and Gupta, P. K., eds. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, pp 53-63.

Lackey, J. A. (1988). Chromosome numbers in the Phaseoleae (Fabaceae:Faboideae) and their relation to taxonomy, *American Journal of Botany* 67: 595-602.

Lackey, J. A. (1981). Phaseoleae DC. In Advances in Legume Systematics, Part l. Pohill, R. M. and Raven, R.H. eds. Royal Botanic Gardens, Kew, pp.301-327.

Lee, J. S. & Verma., D.P.S. (1984). Structure and chromosome arrangement of leghemoglobin genes in kidney bean suggest divergence in soybean leghemoglobin gene loci following tetraploidization. *EMBO J.* 3: 2745-2752.

Leiner, I. E. (1953). Soyin, a toxic protein from the soybean. I. inhibition of rat growth. *Journal of Nutrition* 49:527-540.

Mohamed, A.I., Mebrahtu, T., & Rangappa, M. (1991). Nutrient composition and anti-nutritional factors in selected vegetable soybean [Glycine max (L.) Merr.]. *Plant Foods for Human Nutrition* 41: 89-100.

Murphy, P. A. (1982). Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technology* 36: 60-64.

Newell, C. A. & Hymowitz, T. (1978). A reappraisal of the subgenus Glycine. *American Journal of Botany* 65:168-179.

Oil World Annual (1992). ISTA Mielke GmbH. Germany

Orthoefer, F. T. (1978). Processing and Utilization. In Soybean Physiology, Agronomy, and Utilization, A. G. Norman, ed. Academic Press, New York. pp. 219-246.

Rackis, J. J. (1974). Biological and physiological factors in soybeans. Journal of American Oil Chemists' Society 51:161A-173A.

Rackis, J.J., Wolf, W.J., & Baker, E.C. (1986). Protease inhibitors in plant foods: content and inactivation. In Nutritional and Toxicological Significance of Enzyme Inhibitors in Food. M. Friedman, (ed.). Plenum Press, New York. pp. 299-347.

Senn, H. A. (1938). Chromosome number relationships in the Leguminosae. *Biblio. Genet.* 12: 175-336.

Shibasaki, M., Suzuki, S., Tajima, S., Nemoto, H., & Kuroume, T. (1980). Allergenicity of major component proteins in soybean. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 61:441-448.

Skorupska, H., Albertsen, M.C., Langholz, K.D. & Palmer, R.G. (1989). Detection of ribosomal RNA genes in soybean, *Glycine max* (L.) Merr., by in situ hybridization. *Genome* 32: 1091-1095.

Tindale, M. D. (1984). Two new Eastern Australian species of Glycine Willd. (Fabaceae). *Brunonia* 7:207-213.

Tindale, M. D. (1986a). A new North Queensland species of Glycine Willd. (Fabaceae). *Brunonia* 9:99-103.

Tindale, M. D. (1986b). Taxonomic notes on three Australian and Norfolk Island species of Glycine Willd. (Fabaceae:Phaseolae) including the choice of a neotype of G. clandestine Wendl. *Brunonia* 9:179-191.

United States Department of Agriculture (USDA) (1993). World oilseed situation and outlook. USDA Foreign Agricultural Service, Oilseeds and Products (FOP 4-93).

Wang, G., Kuan, S.S., Francis, O.J., Ware, G.M. & Carman, A.S. (1990). A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 38:185-190.

Wolf, W. J. (1983). Edible soybean protein products. In CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture, Vol. II, Part 2, I. A. Wolff, (ed.). CRC Press, Boca Raton, pp. 23-55.

Description of the donor organism(s)

The donor genes

GTS 40-3-2 contains DNA sequences derived from the following donor organisms:

1. *Agrobacterium* sp. strain CP4 EPSPS gene: The C-terminal 1.36 kb 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene (CP4 EPSPS) (Barry *et al.*, 1992; Padgete *et al.*, 1993).
2. Cauliflower mosaic virus (CaMV) enhanced 35 S promoter (P-E35S): The CaMV promoter (Odell *et al.* 1985) with the duplicated enhancer region (Kay *et al.*, 1985).
3. Petunia hybrida chloroplast transit peptide (CTP): The N-terminal 0.22 kb CTP sequence for the P. hybrida EPSPS gene (Shah *et al.*, 1986). The CTP sequence was fused to the N-terminus of the CP4 EPSPS gene to deliver the CP4 EPSPS protein to the chloroplast, the site of EPSPS activity and glyphosate action.
4. *Agrobacterium tumefaciens* 3' untranslated region of the nopaline synthase gene (NOS 3'): The NOS 3' sequence, isolated from the *A. tumefaciens* Ti plasmid, provides the polyadenylation signal for stable expression (Fraley et al., 1983).

None of the inserted sequences are known to have any pathogenic or harmful characteristics.

The following sequences were present on plasmid PV-GMGT04 but were not integrated into the GTS 40-3-2 genome:

1. Neomycin phosphotransferase II encoding bacterial marker gene (*nptII*): The bacterial selectable marker gene, *nptII*, isolated from the prokaryotic transposon, Tn5 (Beck *et al.*, 1982), encodes for the enzyme neomycin phosphotransferase. This enzyme confers resistance to aminoglycoside antibiotics (*e.g.*, kanamycin or neomycin) used for selection of plasmids in *Escherichia coli*. The promoter for this gene is only active in bacterial hosts.
2. *lacZ*: A partial *E. coli lacI* coding sequence, the promoter Plac, and a partial coding sequence for beta-d-galactosidase or lacZ protein from pUC119 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985).
3. P-MAS: The 0.42 kb TR 2' mannopine synthase promoter region (Velten *et al.* 1984).
4. GUS: the 1.81 kb coding region of the *E. coli* beta-glucuronidase gene (Jefferson *et al.*, 1986). The expression of the gene in plants is used as a scoreable marker for transformation.
5. 7s 3': The 0.43 kn 3' nontranslated region of the soybean 7S seed storage protein alpha subunit (Schuler *et al.*, 1982).
6. FMV 35S: The 0.57 kb figwort mosaic virus 35S promoter (Gowda *et al.*, 1989).

Potential pathogenicity of the donor organism

Only a single new protein, EPSPS, was introduced into soybean variety A5403. The gene encoding this protein was isolated from a naturally occurring soil bacterium, *Agrobacterium* sp. strain CP4. This donor bacterium is not a food source but is related to microbes commonly present in the soil and in the rhizosphere of plants. All plant, microbial, and fungal food sources contain EPSPS proteins, therefore, this enzyme and its activity are not novel to the food supply. *Agrobacterium* strains have also been reported in a number of human clinical specimens, but it is believed that these clinical *Agrobacterium* isolates occur either as incidental inhabitants in the patient or as contaminants introduced during sample manipulation (Kersters and De Ley, 1984).

Characteristics of the donor species, *Agrobacterium*, do not warrant analytical or toxicological tests since only the specific, sequenced gene encoding EPSPS was transferred to soybean. Further detailed information concerning the pathogenicity of other donor organisms is not considered relevant to the risk assessment of GTS 40-3-2 since it was established that only the CP4 EPSPS gene was transferred to the soybean host.

References

Barry, G., G. Kishore, S. Padgette, M. Taylor, K. Kolacz, M. Weldon, D. Re, D. Eichholtz, K. Fincher, & L. Hallas. (1992). Inhibitors of amino acid biosynthesis: strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. In: Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants. B. K. Singh, H. E. Flores, and J. C. Shannon (eds.). American Society of Plant Physiologists pp.139-145.

Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. & Schaller, H. (1982). Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19, 327-336.

Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L.,

Brand, L.A., Fink, C. L., Fry, J. S., Galluppi, G. R, Goldberg, S. B., Hoffman, N. L. & Woo, S. C. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 80, 4803-4807.

Gowda, S., Wu, F.C. & Shepard, R.J. (1989). Identification of promoter sequences for the major RNA transcripts of figwort mosaic and peanut chlorotic streak viruses (caulimovirus group). *J. Cell. Biochem.* 13D (supplement), 301.

Jefferson, R.A, Burgess, S.M. & Hirsch, D. (1986). β-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 83, 8447-8451.

Kay, R., Chan, A., Daly, M. & McPherson, J. (1987). Duplication of the CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236, 1299-1302.

Kersters, K., & De Ley, J. (1984). In: Bergey's Journal of Systematic Bacteriology, Vol. l. Kreig, N. R. & Holt, J. G. (eds.). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 244-248.

Odell, J. T., Nagy, F. & Chua, N.H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313, 810-812.

Padgette, S. R., Barry, G.F., Re, D.B., Weldon, M., Eichholtz, D.A., Kolacz, K.H. & Kishore, G.M. (1993). Purification, cloning, and characterization of a highly glyphosate tolerant EPSP synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4. Monsanto Technical Report MSL-12738, St. Louis.

Schuler, M. A., Schmitt, E.S. & Beachy, R.N. (1982). Closely related families of genes code for alpha and alpha prime subunits of the soybean 7S storage protein complex. *Nucl. Acids Res.* 10, 8225-8244.

Shah D., Horsch, R., Klee, H., Kishore, G., Winter, J., Turner, N., Hironaka, C., Sanders, P., Gasser, C., Aykent, S., Siegel, N., Rogers, S. & Fraley, R. (1986). Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233, 478-481.

Velten, J., Velten, L., Hain, R. & Schell, J. (1984). Isolation of a dual plant promoter fragment from the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* 3, 2723-2730.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved Ml3 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

Description of the genetic modification

Description of the transformation method

Plasmid DNA was introduced into the genome of *G. max* cv. A5403 by the particle acceleration method (particle gun) as described in McCabe *et al.* (1988) and Christou *et al.* (1988). DNA was precipitated onto microscopic gold particles using a calcium phosphate solution, and dried down under a stream of nitrogen. The coated particles were resuspended in ethanol and spread onto a mylar carrier sheet. The mylar sheet was accelerated by the force of vaporization as 10-15 kilovolts were discharged across a water drop. The mylar hit a stainless steel retaining screen which stopped the flight of the sheet but allowed the continued flight of the DNA coated particles. The particles penetrated the target plant cells where the DNA was deposited and incorporated into the cell chromosome.

The transformed cells were incubated on a plant tissue culture medium containing cytokinin and auxin to induce multiple shoot formation. The DNA utilized included a marker gene encoding the beta-glucuronidase (GUS) protein (Jefferson *et al.* 1986). The expression of the GUS protein was used as evidence of transformation as detected by a staining method in which the GUS enzyme converted the substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-d-glucuronide into a blue precipitate. The vast majority of the shoots which were regenerated from the shoot tip cells did not contain any added genes, therefore GUS screening was necessary to identify the genetically modified tissue. The positive shoots were grown to maturity, and the resulting progeny were screened for glyphosate tolerance (by herbicide spray test) and gene expression.

Plasmid PV-GMGT04

Plasmid PV-GMGT04, used to generate line 40-3-2, contained three genes driven by plant promoters: two CP4 EPSPS genes and a gene encoding beta-glucuronidase (GUS) from *E. coli.* PV-GMGT04 is a pUC-Kan vector derived of the high copy *E. coli* plasmid pUC119 (Vieira & Messing 1987) and was constructed by fusing the 1.3 kb *Fsp*I-*Dra*I pUC119 fragment containing the origin of replication to the 1.3 kb *Sma*I-*Hind*III Klenow-filled fragment from pKC7 (Rao & Rogers 1979), which contains the *nptII* gene. The *nptII* gene is driven by a bacterial promoter, preventing its expression in plant cells.

Table 2. Summary of genetic elements in PV-GMGT04

Genetic element	*Size Kb*	*Function*
P-E35S	0.61	The cauliflower mosaic virus (CaMV 35S) promoter with the duplicated enhancer region.
CTP4	0.22	The N-terminal 0.22 kb chloroplast transit peptide sequence from the *Petunia hybrida* EPSPS gene.
CP4 EPSPS	1.36	The C-terminal 1.36 kb 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene (CP4 EPSPS) from an *Agrobacterium* species.
NOS 3'	0.26	The 0.26 kb 3' nontranslated region of the nopaline synthase gene.
KAN	1.32	The Tn5 neomycin phosphotransferase type II gene (*nptII*) from the plasmid pKC7. The *nptII* confers kanamycin resistance.
ori-pUC	0.65	The origin of replication from the high copy *E. coli* plasmid pUC119.
LAC	0.24	A partial *E. coli* lacI coding sequence, the promoter Plac, and a partial coding sequence with beta-d-galactosidase or lacZ protein from pUC119.
P-MAS	0.42	The 0.42 kb TR 2' mannopine synthase promoter region.
GUS	1.81	The 1.81 kb coding region of the *E. coli* beta-glucoronidase gene. The expression of the gene in plants is used as a scoreable marker for transformation.
7S 3'	0.43	The 0.43 kb 3' nontranslated region of the soybean 7S seed storage protein alpha subunit.
CMoVb	0.57	The 0.57kb figwort mosaic virus 35S promoter.

Prior to their combination in a single vector, the CP4 EPSPS and GUS genes were assembled with promoters and 3' sequences in the following steps: the CTP4:CP4 EPSPS fusion was combined with the CMoVb promoter and NOS 3' terminator (Fraley *et al.* 1983) and the GUS gene (already fused to the MAS promoter and 7S 3') in vector pMON13615. The CTP4:CP4 EPSPS fusion was then combined with the E35S (CMoVa) promoter and NOS 3' terminator in plasmid pMON13620 where the entire fusion product was flanked by *Hind*III recognition sequences to facilitate further subcloning. These three elements were then combined in pUC plasmid pMON13639 by subcloning the E35S/CTP4:CP4 EPSPS/NOS 3' fusion product from pMON13620. The *Not*I fragment of pMON13639, which has the CP4 EPSPS and GUS elements, was moved into pMON10081, a derivative of pUC119 which contains the origin of replication (*ori*-pUC) and the *nptII* gene. The resulting vector was PV-GMGT04 (Fig. 1).

Extensive restriction analysis of the plasmid PV-GMGT04 and its progenitor plasmids demonstrated that all of the genetic elements and restriction fragments were correctly assembled and produced the correctly sized DNA fragments (Eichholtz *et al.* 1993). A summary of the genetic elements used to assemble plasmid PV-GMGT04 is presented in Table 2. The cloning performed to construct plasmid PV-GMGT04 was done in nonpathogenic *E. coli* strains LE392, JM101 and MM294.

CP4 EPSPS is a 47.6 kD protein consisting of a single polypeptide of 455 amino acids (Padgette *et al.* 1993). The deduced amino acid sequence is shown in

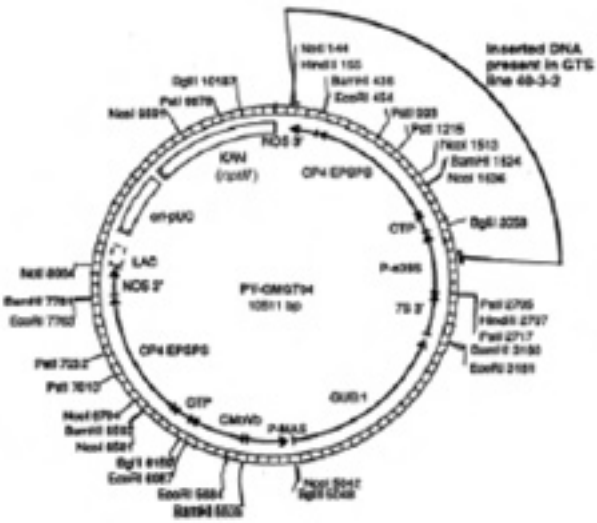


Fig. 1. Schematic representation of plasmid PV-GMGT04 showing restriction enzyme cut sites and the region of plasmid sequence inserted into the host genome.

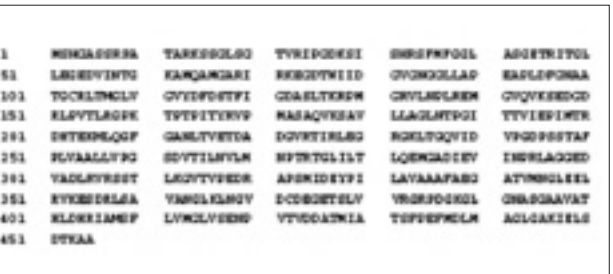


Fig. 2. Deduced amino acid sequence of the *Agrobacterium* sp. Strain CP4 EPSPS gene from pMON17081.

Fig. 2. The identification of codons in the gene encoding four peptide sequences obtained directly from the purified enzymatically-active CP4 EPSPS conclusively demonstrated that the gene cloned was the EPSPS gene from *Agrobacterium* sp. strain CP4.

References

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 Research* **7**, 1-10.

Birch, R.G. (1997). Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **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 Physiology* **115**, 971-980.

Cheng, XY, 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. of the Natl. Acad. of Sci.* **95**, 2767-2772.

Christou, P., McCabe, D.E. & Swain, W.F. (1988). Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. *Plant Physiology* **87**, 671-674.

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.

Eichholtz, D.A., Barry, G.F., Taylor, M.L. & Padgette, S.R. (1993). Construction of DNA vectors for the production of glyphosate-tolerant soybeans. Monsanto Technical Report MSL-12905, St. Louis, MO.

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.

Enríquez-Obregón, G.A., Vázquez-Padrón, R.I., Prieto-Samsónov, D.L., Pérez, M. & Selman-Housein, G. (1997). Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidants compounds. *Biotecnología Aplicada* **14**, 169-174.

Fagard, M. & Vaucheret, H. (2000). (Trans) gene silencing in plants: How many mechanisms? *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 167-194.

Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. & Woo, S.C. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 4803-4807.

Gelvin, S.B. (1998). The introduction and expression of transgenes in plants. Current Opinion in Biotechnology 9, 227-232

Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. & Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oriza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* **6**, 271-282.

Hooykaas, P.J.J. & Shilperoort, R.A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* **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 Biotechnology* **4**, 745-750.

Jefferson, R.A., Burgess, S.M. & Hirsch, D. (1986). Beta-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8447-8451.

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. *The Plant Journal* **11**, 945-957.

Matzke, A.J.M. & Matzke, M.A. (1998). Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 142-148.

May, G.D., Afza, R., Mason, H.S., Wiecko, A., Novak, F.J. & Arntzen, C.J. (1995). Generations of transgenic Banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biotechnology* **13**, 486-492.

McCabe, D.E., Swain, W.F., Martinell, B.J. & Christou, P. (1988). Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* **6**, 923-926.

Padgette, S.R., Re, D.B., Gasser, C.S., Eichholtz, D.A., Frazier, R.B., Hironaka, C.M., Levine, E.B., Shah, D.M., Fraley, R.T. & Kishore, G.M. (1993). Purification, cloning, and characterization of a highly glyphosate-tolerant EPSP synthase from

Agrobacterium sp. strain CP4. Monsanto Technical Report MSL-12738, St. Louis, MO.

Powlowski, W.P. & Somers, D.A. (1996). Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. *Molecular Biotechnology* **6**, 17-30.

Powlowski, W.P. & Somers, D.A. (1998). Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **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 Molecular Biology* **28**, 1149-1154.

Rao, R.N. & Rogers, S.G. (1979). Plasmid PKC7: A vector containing ten restriction endonuclease sites suitable for cloning DNA segments. *Gene* **7**, 79.

Tempe, J. & Schell, J. *In:* Translation of Natural and Synthetic Polynucleotides, A.B. Legocki, Ed. (Poznan University of Agriculture, Poznan, Poland, 1977) p.416.

Vieira, J. & Messing, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology* **153**, 3-11.

Wenck, A., Czako, M., Kanevski, I. & Marton, L. (1997). Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Molecular Biology* **34**, 913-922.

Characterization of the genetic modification

Characterization of the primary insert

In order to determine the number of insertion sites of PV-GMGT04 DNA in line 40-3-2, genomic DNA isolated from 40-3-2 and control line A5403 (Dellaporta *et al.* 1983) was digested with *Spe*I and subjected to Southern blot analysis (Southern 1975). The blot was probed with 32P-labelled PV-GMGT04, which does not contain a restriction site for *Spe*I. Line 40-3-2 DNA produced a single band of high molecular weight DNA that was absent from the control lane (Fig. 3, lanes 2 and 3). These results suggest that PV-GMGT04 DNA is present at a single site in 40-3-2 genomic DNA. Three additional bands of lighter intensity, present in both the 40-3-2 and A5403 lanes, represent naturally-occurring cross-hybridizing sequences in A5403 soybean.

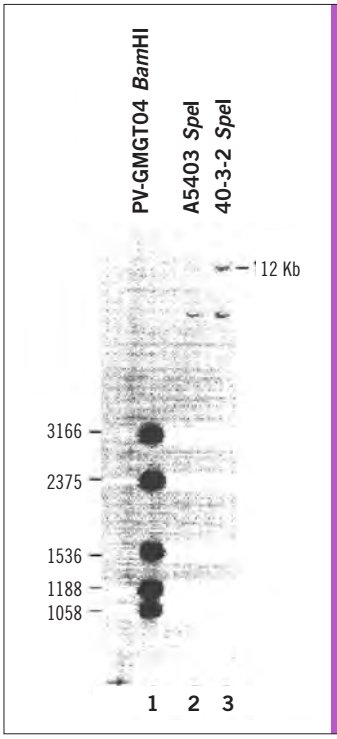


Fig. 3. Southern blot analysis of PV-GMGT04 plasmid DNA digested with *Bam*HI (lane 1), and soybean genomic control A5403 DNA (lane 2) and GTS 40-3-2 genomic DNA (lane 3) digested with *Spe*I. Each lane represents approximately 100 pg of plasmid DNA or approximately 5 ug of genomic DNA. The digests were subjected to electrophoresis in a 0.8% agarose gel and transferred to a nylon membrane. The membrane was probed with ^{32}P labelled PV-GMGT04 plasmid DNA and subjected to autoradiography.

The number of insertion sites and the approximate size of inserts were also investigated by Southern blot analyses using three restriction enzymes that cut within the plasmid PV-GMGT04. Genomic DNA from GTS 40-3-2 and A5403 was digested with *Bam*HI, *Hind*III, and *Eco*RI, and the separated fragments probed with 32P-labelled PV-GMGT04.

Table 3 lists the predicted sizes of fragments of *Bam*HI, *Hind*III and *Eco*RI digested PV-GMGT04, as well as the sizes of the bands observed for 40-3-2 (Fig. 4, lanes 3, 5 and 7). For *Bam*HI-digested PV-GMGT04 (Fig. 4, lane 1) the observed 1.2 kb fragment corresponded to an anticipated 1.2 kb fragment of PV-GMGT04 (Fig. 4, lane3). The two additional hybridizing bands (Fig. 4, lane 3), which do not match in size to any band in the *Bam*HI PV-GMGT04 digest, are border fragments which contain part of the plasmid DNA attached to plant genomic DNA. *Hind*III cuts twice within PV-GMGT04 but only one hybridizing band was detected for 40-3-2 (Fig. 4, lane 5), indicating that at least one or both *Hind*III sites were absent from the insert. As shown in Fig. 1, an *Eco*RI site is present in the 1.2 kb CP4 EPSPS *Bam*HI fragment of PV-GMGT04. Two bands were observed for *Eco*RI digested 40-3-2 DNA (Fig. 4, lane 7), indicating that *Eco*RI cuts once within the CP4 EPSPS gene of the insert to generate two border fragments. The presence of no more than two border fragments for *Bam*HI, *Hind*III and *Eco*RI digested 40-3-2 DNA confirms the presence of a single insertion site. The total size of the hybridizing bands was less than 6 kb in the three

digestions, indicating that a PV-GMGT04 fragment of less than 6 kb was integrated into the plant genome.

A combination of PCR and Southern blot analyses was used to characterize the single insert present in line 40-3-2.

ori-pUC

To analyze for the presence of the pUC origin of replication (*ori*-pUC), oligonucleotides corresponding to the 5' and 3' sequences of ori-pUC were used in a polymerase chain reaction (PCR) analysis (Mullis & Faloona l987; McPherson *et al.* 1991) of genomic DNA from 40-3-2, 61-137 and A5403. 61-137 is an experimental glyphosate tolerant soybean line, transformed with the plasmid PV-GMGT04 and known to contain sequences corresponding to the ori-pUC region. As shown in Fig. 5, DNA from line 61-137 and PV-GMGT04 produced bands of the expected size of 671 bp (lanes 4 and 5). No bands of this size were observed for either 40-3-2 or the control A5403 (lanes 2 and 3). These results established that an intact *ori*-pUC element was not present in line 40-3-2.

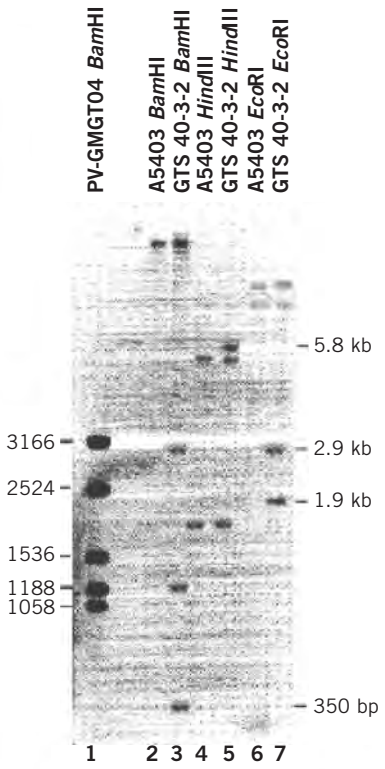


Fig. 4. Southern blot analysis of PV-GMGT04 DNA digested with *Bam*HI (lane 1), soybean A5403 control DNA digested with *Bam*HI (lane 2), *Hind*III (lane 4) and *Eco*RI (lane 6), and 40-3-2 DNA digested with *Bam*HI (lane 3), *Hind*III (lane 5) and *Eco*RI (lane 7). Each lane represents approximately 100 pg of plasmid DNA or approximately 5 ug of genomic DNA. DNA was subjected to electrophoresis through a 0.8% agarose gel and transferred to a nylon membrane. The membrane was probed with 32P labelled PV-GMGT04 plasmid DNA and subjected to autoradiography.

Table 3. Restriction analysis of line 40-3-2 and plasmid PV-GMGT04

***Restriction fragments size (bp)*[1]**

Bam*HI*		**Hind*III***		**Eco*RI***	
Plasmid	*40-3-2*	*Plasmid*	*40-3-2*	*Plasmid*	*40-3-2*
3166		7959		3202	
	2900		5800		2900
2375		2552		2727	
1536				2503	
1188	1200				1900
1058				1646	
	350			403	

1. The values for the plasmid PV-GMGT04 are based on calculated sizes (Fig. 1). The values for 40-3-2 are estimated from gel migration relative to molecular weight markers (Fig. 4). Bands present in both the experimental and control lanes are not listed.

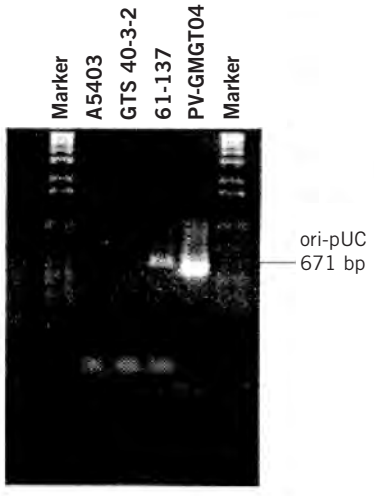


Fig. 5. PCR analysis of line 40-3-2 genomic DNA for ori-pUC. Genomic DNA from control line A5403 and event 40-3-2 were analyzed using PCR to determine the presence or absence of the pUC origin of replication. The positive DNA controls were PV-GMGT04 plasmid DNA and 61-137, a soybean line containing ori-pUC. A 5' and a 3' oligonucleotide were made identical to the 5- and 3'ends of ori-pUC. Reactions were done in 100 ul total volume containing 100 pg of each oligo, 1 ug template, dNTPs at 200 uM, 10 units of Taq DNA Polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). The PCR amplification cycle consisted of 94°C denaturation for 1.5 min, 55°C annealing for 1.5 min, and a 72°C extension for 3 min. The cycle was repeated 24 times. Products were separated on a 1.25% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. The lower bands at the bottom of the gel are unused oligos.

nptII

PCR analysis was also used to test for the presence of the *nptII* gene in line 40-3-2. Four oligonucleotides were used: 5' and 3' oligonucleotides corresponding to the ends of the *nptII* gene, and 5' and 3' oligonucleotides internal to the gene. Genomic DNA from 40-3-2, 61-137 and A5403, and PV-GMGT04 plasmid DNA was used as template. The oligonucleotides were used in four combinations: 5' end and 3' end; 5' end and 3' internal; 3' end and 5' internal; and both internal primers. As shown in Fig. 6, PV-GMGT04 (lanes 5 and 11) and 61-137 (lanes 6 and 12) produced the correct size PCR products. Lines 40-3-2 (lanes 3 and 9) and A5403 (lanes 2 and 8) showed none of the predicted *nptII* PCR products. These results established that an intact *nptII* gene was not present in line 40-3-2.

CP4 EPSPS

Genomic DNA from A5403 and 40-3-2 was digested with *Hind*III, or *Bg*lII/*Eco*RI. The blot was hybridized with a 32P-labelled probe specific to the CP4 EPSPS coding region. A 5.8 kb band of *Hind*III digested 40-3-2 DNA hybridized with the CP4 EPSPS gene (Fig. 7, Panel A, lane 5), indicating that the CP4 EPSPS gene (or gene fragment) was present in line 40-3-2. This 5.8 kb band was also evident in Fig. 4 (lane 5). The CP4 EPSPS probe

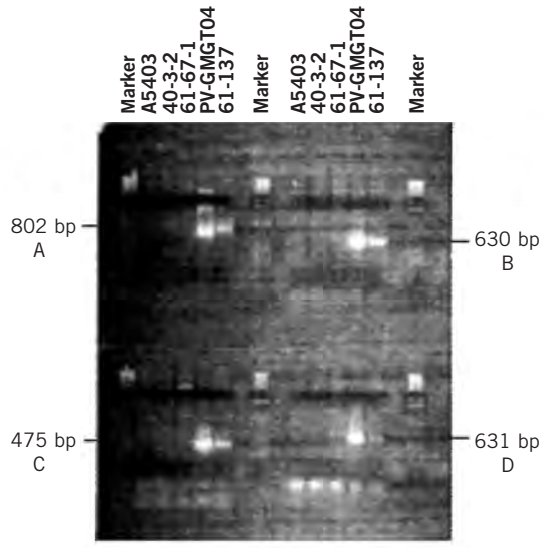


Fig. 6. PCR analysis of line 40-3-2 genomic DNA for nptII. Soybean genomic DNA from the GTS 40-3-2 was analyzed using PCR to determine the presence or absence of the *npt*II gene. The negative controls were A5403 and 61-67-1, an experimental GTS line negative for nptII. Two positive controls were used: PV-GMGT04 plasmid DNA and 61-137, a GTS line positive for nptII. Four oligonucleotides were used in this analysis: a 5' and a 3' oligo were made identical to the ends of the gene, and a 5' and a 3' oligo were made identical to internal sequences of the gene: nptII 5' (nt 10159 to 10140), nptII 5' internal (nt 10005 to 9988), nptII 3' end (nt 9357 to 9370), and nptII 3' internal (nt 9511 to 9529). The predicted product sizes are: A= 5' end + 3' end, 802 bp; B = 5' end + 3' internal, 630bp; C = 5' internal + 3' internal, 475 bp; and D = 5' internal + 3' end 631 bp. Reactions were done in 100ul total volume, containing 100 pg of each indicated oligo, 1 ug template, dNTPs at 200 uM, 10 units Taq DNA Polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). The PCR amplification cycle consisted of 94°C denaturation for 1.5 min, 63°C annealing for 1.5 min, and a 72°C extension for 6 min. The cycle was repeated 24 times. Products were separated on a 1.25% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. The lower bands at the bottom of each gel are unused oligos.

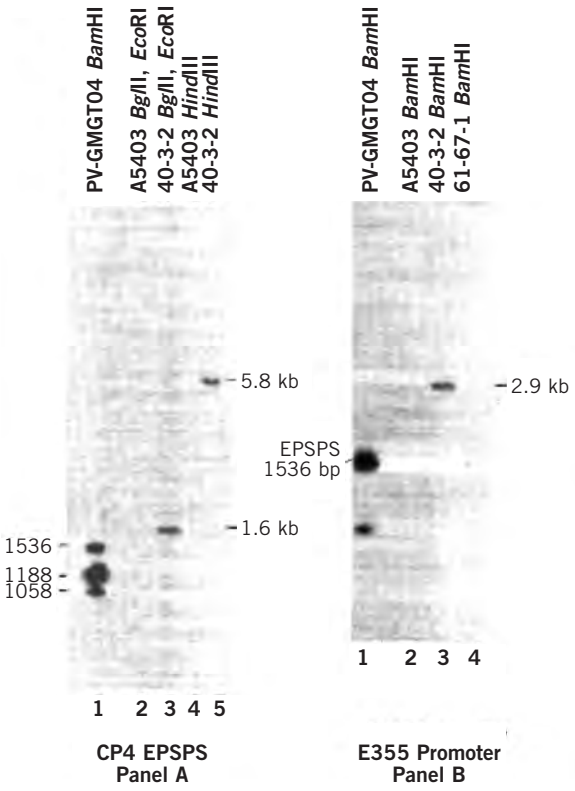


Fig. 7. Southern blot analysis with CP4 EPSPS and E35S probes. PV-GMGT04 plasmid DNA was digested with *Bam*HI (lane 1 in both panels). Genomic DNA from A5403 control was digested with *Bg*III/*Eco*RI (panel A, lane 2), *Hind*III (panel A, lane 4) and *Bam*HI (panel B, lane 2). GTS line 40-3-2 DNA was digested with BglII/EcoRI (panel A, lane 3), *Hind*III (panel A, lane 5), and *Bam*HI (panel B, lane 3). GTS 61-67-1, a negative control for E35S was digested with *Bam*HI (panel B, lane 4). Each lane represents approximately 100 pg of plasmid DNA or approximately 5 ug of genomic DNA. The digests were subjected to electrophoresis in a 0.8% agarose gel and transferred to a nylon membrane. The membranes were probed with ^{32}P-labelled coding region of CP4 EPSPS (panel A), or E35S promoter (panel B), and then subjected to autoradiography. The smaller mark in lane 1 of panel B is a dot on the blot and not an additional band.

was predicted to hybridize with a 2552 bp band of *Hind*III-digested PV-GMGT04 DNA (Fig. 4.1). No fragment of this size was detected for 40-3-2, indicating that at least one of the PV-GMGT04 *Hind*III sites was not transferred to line 40-3-2. A band of 1.6 kb *Bg*lII/+*Eco*RI-digested 40-3-2 DNA (Fig. 7, Panel A, lane 3) hybridized with the CP4 EPSPS probe, indicating that an intact CP4 EPSPS gene was present in 40-3-2.

E35S promoter

A Southern blot was performed using A5403 and 40-3-2 DNA digested with *Bam*HI, and probed with 32P-labelled E35S promoter DNA. The E35S element, or a portion of it, was present in line 40-3-2 (Fig. 7, Panel B, lane 3); a single band of 2.9 kb was detected for 40-3-2, corresponding to the border fragment detected in Fig. 4 (lane 3) and discussed above. Since E35S is located on a 1536 bp *Bam*HI fragment of PV-GMGT04 (Fig. 1), and no fragment of this size was detected for 40-3-2, it is clear that the *Bam*HI site at nucleotide (nt) 3160 (Fig.1) was not present in line 40-3-2.

NOS 3'

A Southern blot was performed using A5403 and 40-3-2 DNA digested with *Hind*III, and probed with 32P-labelled NOS 3' terminator DNA. At least a portion of the NOS 3' element is present in 40-3-2 (Fig. 8, lane 10) as a single band of 5.8 kb was detected for line 40-3-2, corresponding to the border fragment detected in Fig. 5.2 (lane 5) and discussed above. A5403 and 40-3-2 DNA was subsequently digested with *Eco*RI/*Bg*lII and *Eco*RI/*Hind*III. A 0.8 kb fragment of *Eco*RI/*Hind*III digested 40-3-2 DNA hybridized with the NOS 3' probe (lane 5) where the map predicted size is 0.3 kb. A 1.2 kb fragment of *Eco*RI/*Bg*lII digested 40-3-2 DNA hybridized to the NOS 3' (lane 3) probe where the predicted size is 0.8 kb. These results indicate that the *Hind*III site at nt 155 and the *Bg*lII site at nt 10187 were not present in the insert of 40-3-2.

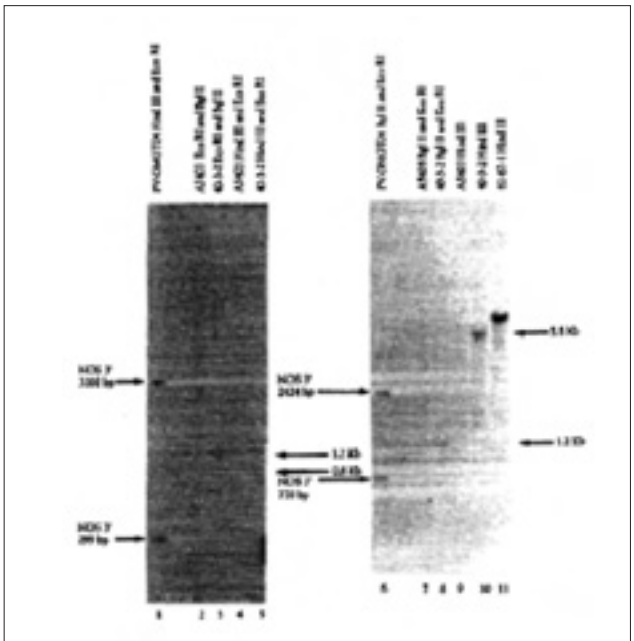


Fig. 8. Southern blot analysis with NOS 3' probe. PG-GMGT04 plasmid DNA was digested with *Hind*III/EcoRI (lane 1) and *Bg*lII/*Eco*RI (lane 6). Genomic DNA from A5403 control was digested with *Eco*RI/*Bg*lII (lanes 2 and 7), with *Hind*III/EcoRI (lane 4), and with *Hind*III (lane 9). GTS line 40-3-2 was digested with *Bg*lII/*Eco*RI (lanes 3 and 8), with *Hind*III and EcoRI (lane 5) and with*Hind*III (lane 10). GTS line 61-67-1, a positive control for NOS 3' was digested with *Hind*III (lane 11). Each lane represents approximately 100 pg of plasmid DNA or approximately 5 ug of genomic DNA. The digests were subjected to electrophoresis in a 0.8% agarose gel and transferred to a nylon membrane. Both panels were probed with ^{32}P labelled NOS 3' and then subjected to autoradiography.

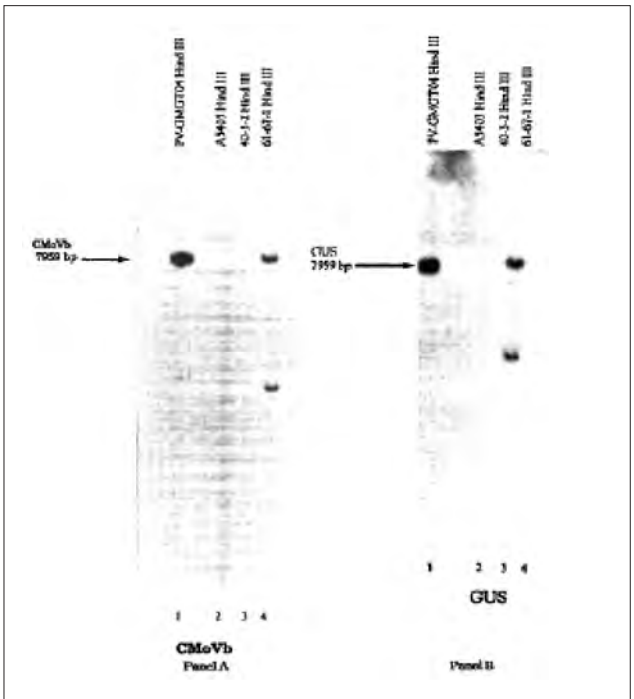


Fig. 9. Southern blot analysis with CMoVb and GUS probes. PV-GMGT04 plasmid DNA was digested with *Hind*III (panels A and B, lanes 1). Soybean A5403 control DNA was digested with *Hind*III (panels A and B, lanes 2). GTS line 40-3-2 DNA was digested with *Hind*III (panels A and B, lanes 3), and GTS line 61- 67-1 DNA was digested with *Hind*III (panels A and B, lane 4). Each lane represents approximately 100 pg plasmid DNA or approximately 5 pg of genomic DNA. The digests were subjected to electrophoresis in a 0.8% agarose gel and transferred to a nylon membrane. The membranes were probed with 32P labelled CMoVb promoter (panel A) or the coding region of GUS (panel B) and then subjected to autoradiography.

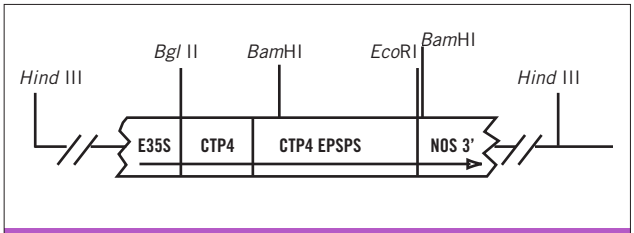


Fig. 10. Predicted DNA insert in soybean event 40-3-2 located on a 5.8 kb *Hind*III restriction fragment.

CMoVb promoter

A Southern blot was performed using A5403 and 40-3-2 DNA digested with *Hind*III, and probed with 32P-labelled CMoVb promoter. As shown in Fig. 9, no band was detected for line 40-3-2 (Panel A, lane 3), indicating that the CMoVb promoter DNA is not present in line 40-3-2. GTS line 61-67-1, which contains the CMoVb promoter, provided a positive control (Panel A, lane 4).

GUS

A Southern blot was performed using A5403 and 40-3-2 DNA digested with *Hind*III, and probed with ^{32}P-labelled GUS coding region. As shown in Fig. 9, no band was detected for 40-3-2 (Panel B, lane 3), indicating that GUS is not present in this line. GTS line 61-67-1, which contains the GUS gene, provided a positive control (Panel B, lane 4).

Characterization of the secondary insert

Additional characterization of GTS 40-3-2 was undertaken using a Southern blot method with higher sensitivity than that used in the initial characterizations (Re *et al.* 1993; Kolacz & Padgette 1994; Padgette *et al.* 1996). DNA from event 40-3-2 and the R3 progeny generation (Resnick BC1F2) used to develop commercial varieties was digested with the restriction enzyme *Hind*III and subjected to Southern blot hybridization analysis using a full length CP4 EPSPS coding sequence probe. A5403 control DNA and A5403 control DNA spiked with plasmid PV-GMGT04 DNA were also digested with *Hind*III and used as controls. The results are shown in Fig. 11. A5403 control DNA (lane 2) showed no hybridization bands, as expected, while A5403 control DNA spiked with plasmid PV-GMGT04 DNA (lane 3) produced two bands at ~2.5 kb and ~8.0 kb as predicted from the plasmid map in Fig. 1. Resnick BC1F2 DNA (lane 4) and event 40-3-2 DNA (lane 5) produced the expected size band at approximately 5.8 kb, which represents the primary, functional insert, as well as a band at approximately 900 bp. There is a slight difference in the migration of the ~900 bp band between the two samples due to variations in DNA quality.

To more clearly define the region of CP4 EPSPS present on the ~900 base pair *Hind*III restriction fragment, genomic DNA extracted from both 40-3-2 and Resnick BC1F2 material was analyzed by Southern blot hybridization with sequential portions of the CP4 EPSPS coding sequence and the NOS 3' transcriptional termination element (see diagram at bottom of Fig. 12). A5403 control DNA, A5403 control DNA spiked with plasmid PV-GMGT04 DNA, Resnick BC1F2 DNA, and 40-3-2 DNA were digested with *Hind*III and included on all Southern blots. Southern blot analyses on the Resnick BC1F2 and 40-3-2 DNA samples performed using the NOS 3' probe and three CP4 EPSPS probes (Probe-1, Probe-2, and Probe-4) generated only the expected band at ~5.8 kb representing the primary, functional insert in

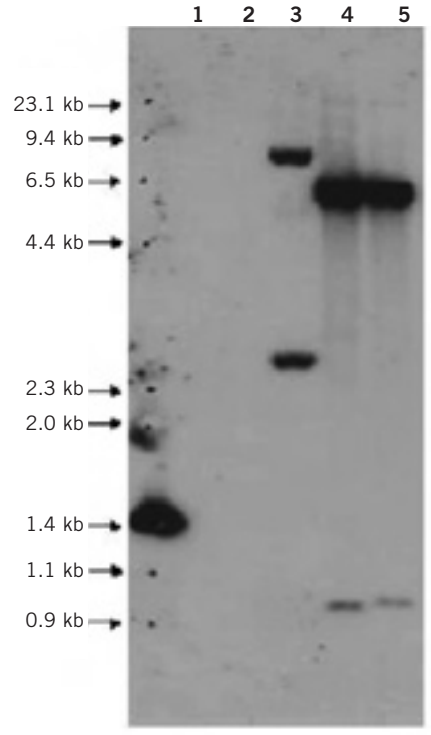


Fig. 11. Southern blot analysis of event 40-3-2. Ten micrograms of genomic DNA extracted from leaf tissue of A5403 control (lane 2), A5403 control spiked with ~15 pg PV-GMGT04 plasmid DNA (lane 3), Resnick BC1F2 (lane 4), and 40-3-2 (lane 5) were digested with *Hind*III. Lane 1 was left blank. The blot was probed with the ^{32}P-labelled full length CP4 EPSPS coding region. The arrow symbol denotes sizes obtained from MW markers on ethidium stained gel.

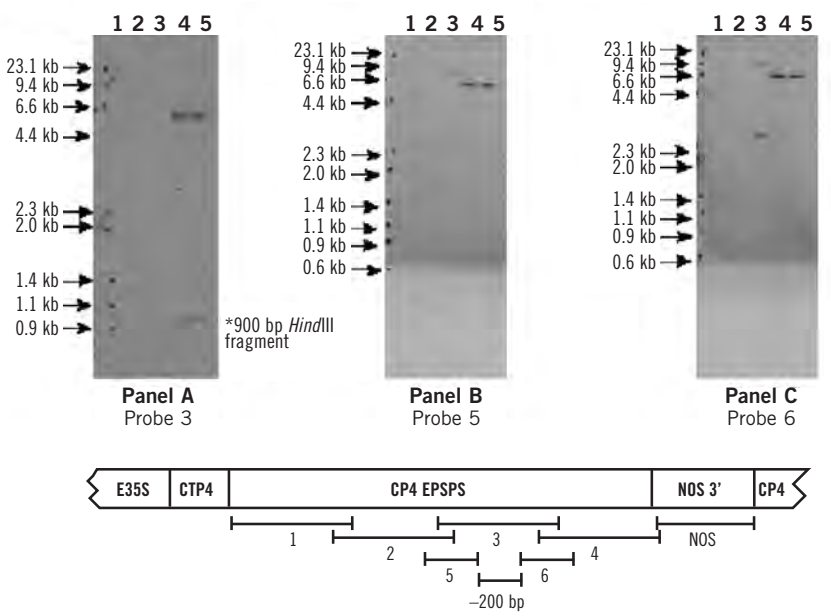


Fig. 12. Southern blot analysis using overlapping CP4 EPSPS probes. Ten micrograms of genomic DNA extracted from leaf tissue of A5403 control (lane 2), A5403 control spiked with ~15 pg PV-GMGT04 plasmid DNA (lane 3), Resnick BC1F2 (lane 4), and 40-3-2 (lane 5) were digested with *Hind*III. Lane 1 is blank in all panels. Panel A was probed with CP4 EPSPS probe-3, panel B with CP4 EPSPS Probe-5, and panel C with CP4 EPSPS probe 6. The blot in panel A is the result of stripping and reprobing of the blot in Fig. 11. The positions of the probes with respect to the CP4 EPSPS coding sequence and NOS are illustrated on the linear map below the panels with the probes used in panels A, B, and C in bold print. The arrow symbol denotes sizes obtained from MW markers on ethidium stained gel.

soybean event 40-3-2 (data not shown). The only Southern blot on which the ~900 bp HindIII restriction fragment was observed in the Resnick BC1F2 DNA and 40-3-2 DNA samples is shown in Fig. 12, Panel A. This blot was probed with CP4 EPSPS Probe-3 (see diagram at bottom of Fig. 12). The blot in Fig. 11 was stripped and reprobed to generate this result, therefore the size of the ~900 bp HindIII restriction fragment is again slightly shifted between the two soybean event 40-3-2 samples. Probes designed to overlap the 5' and 3' ends of CP4 EPSPS Probe-3 did not hybridize to the ~900 bp *Hind*III fragment (Fig. 12, Panels B and C). These results indicate that the NOS 3' transcriptional termination element is not present on the ~900 bp *Hind*III restriction fragment, and that the portion of the CP4 EPSPS coding region contained within the ~900 bp HindIII restriction fragment is less than 200 bp in length.

To further delineate the CP4 EPSPS sequence present on the ~900 bp *Hind*III restriction fragment, a pool of cosmid DNA which contained the ~900 bp HindIII restriction fragment was digested with *Hind*III, separated by agarose gel electrophoresis and transferred to a nylon membrane. The plasmid vector PV-GMGT04 was used as a positive hybridization control and should result in the visualization of two bands at ~8.0 kb and ~2.5 kb based on the plasmid map (Fig. 1). Several identical blots were hybridized separately with oligonucleotide probes 3'-end labelled with digoxigenin-11-dUTP (see diagram at bottom of Fig. 13). Hybridization of the cosmid DNA was not observed with the oligonucleotide probes Oligo-1, Oligo-2, Oligo-3, Oligo-4, Oligo-8 and Oligo-9, although the probes did hybridize to the PV-GMGT04 plasmid positive control, indicating that the conditions employed were conducive for hybridization (data not shown). However, oligonucleotide probes Oligo-5 and Oligo-6 did hybridize to the ~900 bp *Hind*III restriction fragment in the DNA extracted from the cosmid DNA (data not shown). The pool of cosmid clones was further screened to isolate single colonies that contained the ~900 bp *Hind*III restriction fragment. The purified cosmid clone 6A was digested with *Hind*III, separated by agarose gel electrophoresis, and transferred to a nylon membrane. The controls were identical to those used in the experiment on the cosmid pool. Hybridization was observed between the oligonucleotide probes Oligo-5 and Oligo-6 with the ~900 bp *Hind*III restriction fragment as was previously observed with DNA prepared from the pool. However, oligonucleotide probe Oligo-7 located immediately 3' of the Oligo-6 probe did not hybridize to the ~900 bp *Hind*III restriction fragment in the cosmid DNA prepared from clone 6A. Oligonucleotide probe Oligo-4, located immediately 5' of Oligo-5 probe and used on the pool of cosmid DNA, also did not hybridize to the ~900 bp *Hind*III restriction fragment (Fig. 13). The two oligonucleotide probes, Oligo-5 and Oligo-6, which did hybridize to the ~900 bp *Hind*III restriction fragment in the DNA from cosmid clone 6A, are contiguous in the CP4 EPSPS coding region and represents a minimum of 53 bp of the maximum 200 bp region expected to be present from previous probe walking experiments on soybean event

40-3-2 genomic DNA (Fig. 12). In conclusion, the oligonucleotide probe hybridization to the cosmid clones allowed the portion of the CP4 EPSPS sequence present on the ~900 bp *Hind*III restriction fragment to be defined as ~53 bp consisting of sequence which hybridized to the Oligo-5 and Oligo-6 probes (Fig. 13).

Oligo-5 and Oligo-6 (Fig. 13) were used as primers to generate DNA sequence directly from purified cosmid clones 6A and 4B (a second cosmid clone shown to contain a similar insert to 6A) in both the 5' and 3' directions. Multiple primers were then designed to the resulting potential 5' and 3' flanking sequences and paired with Oligo-5 and Oligo-6 primers. PCR products were obtained and subsequenly sequenced. The combination of DNA sequence data revealed that 72 bp of CP4 EPSPS (base pairs 855-926, Fig. 1) are located on a 937 bp *Hind*III restriction fragment. No other sequences derived from plasmid PV-GMGT04 (Fig. 1) used in the transformation of soybean event 40-3-2 were identified on the 937 bp *Hind*III restriction fragment. A schematic of the additional insert is shown in Fig. 14. The observation that only 72 bp of the CP4 EPSPS sequence are present on the 937 bp *Hind*III restriction fragment explains the low hybridization intensity of this band when compared to the ~5.8 kb *Hind*III restriction fragment containing the primary, functional insert when probed with a full-length CP4 EPSPS probe (Fig. 11, lanes 4 and 5). This observation also accounts for why the additional CP4 EPSPS segment was not observed using less sensitive methods used to characterize the primary insert as described.

PCR analyses were performed on DNA extracted from Resnick BC1F2 and event 40-3-2, as well as isolated cosmid clones 4B and 6A, to demonstrate that the 5' and 3' genomic flanking sequences of the 72 bp CP4 EPSPS segment were consistent in all samples. Three different PCR analyses were performed, including one PCR verifying the 5' genomic flanking sequence using Primers A and B, a second PCR verifying the 3' genomic flanking sequence using Primers A' and C, and a third PCR amplifying from the 5' genomic flanking sequence to the 3' genomic flanking sequence using Primers B and C. The positions of all primers as well as the results of all PCR analyses are shown in Fig. 15. The control reactions without template (lanes 7, 13, and 19) and A5403 non-transgenic negative control DNA (lanes 6, 12, and 18) did not generate a PCR product in any of the analyses. The Resnick BC1F2 DNA samples (lanes 2, 8, and 14), the 40-3-2 samples (lanes 3, 9, and 15), cosmid clone 4B (lanes 5, 11, and 17) and cosmid clone 6A (lanes 4, 10, and 16)

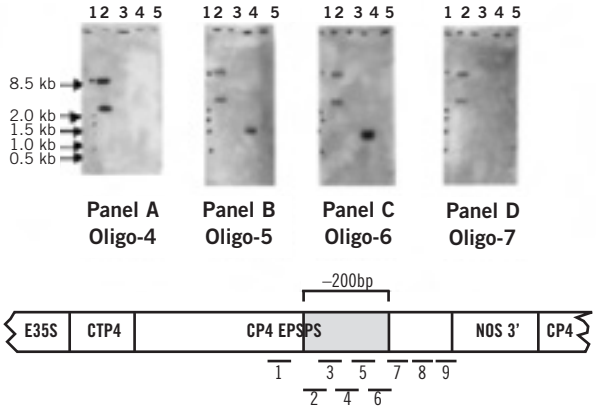


Fig 13. Southern blot analysis with various oligonucleotide probes of cosmid DNA prepared from the isolated cosmid clone 6A. Oligonucleotide probes were 3'-end labelled with digoxigenin-11-dUTP and probed against individual Southern blots of DNA from the purified cosmid clone 6A digested with *Hind*III (lane 4, 4 ng per lane except for panel A where 900 pg of DNA from a pool of cosmid DNA was used). Molecular weight marker DNA was loaded in lane 1 of each panel for size estimation of the bands being observed. The same molecular weight marker was used for each panel. Plasmid PV-GMGT04 digested with the *Hind*III served as a positive control (lane 2, 1 ng per lane). Lanes 3 and 5 of each panel were blank. The positions of the oligonucleotide probes with respect to the CP4 EPSPS coding sequence are illustrated on the linear map below the panels with the probes used in panels A-D in bold print. The shaded ~200 bp region represents the maximum region delineated to be present on the ~900 bp *Hind*III fragment of DNA from 40-3-2 that was observed to hybridize with CP4 EPSPS probe-3. The arrow symbol denotes sized obtained from MW markers on ethidium bromide stained gel.

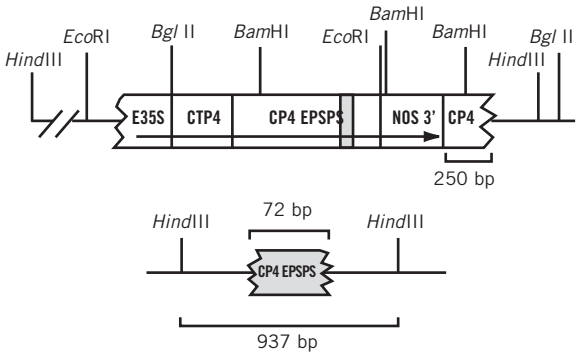


Fig. 14. Predicted DNA inserts in soybean event 40-3-2 based on genome walking, higher sensitivity Southern blot analysis, genomic cloning, nucleotide sequencing and PCR. There is an additional 250 bp segment of the CP4 EPSPS sequence immediately adjacent to the NOS 3' transcriptional termination element on the primary insert and an additional insert located on a 937 bp *Hind*III restriction fragment consisting of 72 bp of the CP4 EPSPS sequence. The shaded region in the CP4 EPSPS sequence in the functional primary insert represents the 72 bp present in the second insert.

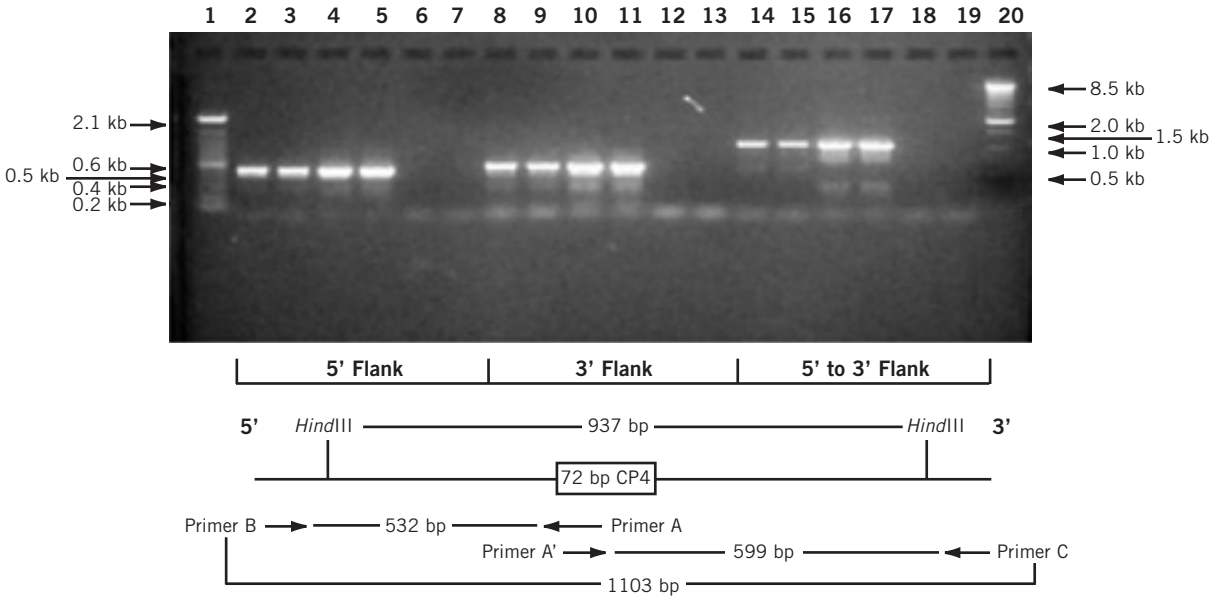


Fig 15. PCR analyses of second insert. PCR analyses were performed using primers A and B to confirm the 5' flanking sequence, primers A' and C to confirm the 3' flanking sequence, and primers B and C to perform PCR from the 5' to 3' flank on DNA extracted from leaf tissue of Resnick BC1F2 (lanes 2, 8, and 14) and 40-3-2 material (lanes 3, 9, and 15), as well as cosmid clones 6A (lanes 4, 10, and 16) and 4B (lanes 5, 11, and 17) DNA. Lanes 1 and 20 contain Gibco BRL 100 bp DNA ladder and 500 bp DNA ladder, respectively. Lanes 6, 12, and 18 contain A5403 non-transgenic DNA PCR reactions and lanes 7, 13, and 19 were no template control PCR reactions. Ten microliters of each PCR reaction was loaded on the gel. The arrow symbol denotes sizes obtained from MW markers on ethidium bromide stained gel.

generated the expected specific size PCR products of 532 bp for the 5' flanking sequence, 599 bp for the 3' flanking sequence, and 1103 bp for the 5' to 3' flanking sequence (see diagram at bottom of Fig. 15). The PCR products from similar reactions were subjected to DNA sequencing. The results revealed that the genomic flanking sequence present in cosmid clones 4B and 6A is consistent with the genomic flanking sequence in Resnick BC1F2 material and 40-3-2 material. These results further establish the validity of the cosmid clones used in this analysis and establish that the second insert in event 40-3-2 consists of 72 bp of the CP4 EPSPS element (base pairs 855-926 of PV-GMGT04, Fig. 1) located on a 937 bp *Hind*III restriction fragment with no other sequences from plasmid PV-GMGT04 used in the transformation of the event.

Sequence of the 5' and 3' ends of the primary insert

The PCR-based technique GenomeWalker (CLONTECH, Palo Alto, CA) was used to generate PCR products containing DNA at the 5' and 3' ends of the inserted DNA, as well as the DNA flanking the 5' and 3' ends of the primary insert in soybean event 40-3-2. The PCR products were subjected to DNA sequencing and multiple primers designed to the flanking sequences were paired with insert specific primers located: in the E35S promoter, to validate the sequence at the 5' end of the inserted DNA and the 5' flanking genomic sequence; and in the NOS 3' transcriptional termination element, to validate the DNA sequence at the 3' end of the inserted DNA and the sequence of the 3' flanking genomic DNA. PCR products were obtained and sequenced. The resulting sequences are shown in Fig. 5.14 and Fig. 17. Figure 16 contains the 5' DNA sequence which shows that the first 354 bp of the E35S promoter are missing with the insert beginning at base pair 2347 of PV-GMGT04 (Fig. 1). This deletion removes a duplicated portion of the E35S enhancer region and is not likely to have a significant effect on the functionality of the promoter since the region necessary for transcriptional initiation remains intact (Odell *et al.* 1985). In addition to the 105 bp of E35S which were sequenced, 186 bp of the soybean genomic DNA adjacent to the 5' end of the inserted DNA is shown in Fig. 16. Figure 17 contains the 3' DNA sequence, which demonstrates that the entire NOS 3' transcriptional termination element is present

rather than the partial NOS sequence reported above. Adjacent to the inserted DNA ending at base pair 160 of PV-GMGT04 (Fig.1), a previously unobserved 250 bp portion of the CP4 EPSPS element was identified which consists of base pairs 195-444 in Fig. 17. This sequence corresponds to base pairs 1490-1739 of PV-GMGT04 in Fig. 1. Figure 17 also shows the sequence of 416 bp of flanking soybean genomic DNA. This CP4 EPSPS segment (base pairs 1490-1739 of PV-GMGT04, Fig. 1) does not contain a promoter or 3' transcriptional termination element, therefore transcription and subsequent translation of this region is highly unlikely. A northern blot was conducted which established that no mRNA is detected other than the full-length mRNA. Furthermore, in the highly unlikely event that this region would have been transcribed and translated as a fusion to the full length CP4 EPSPS protein, western blot analysis using antisera to CP4 EPSPS would have resulted in a higher molecular weight protein species being detected. No protein other than the full-length CP4 EPSPS was observed (Rogan *et al.* 1999), strongly suggesting that this DNA sequence is not transcribed or translated as a fusion protein.

Summary

In conclusion, it was determined that GTS 40-3-2 contained two inserted DNA segments, one containing a functional CP4 EPSPS gene construct (partial E35S promoter, chloroplast transit peptide signal sequence, CP4 EPSPS encoding sequence and NOS 3' terminator), and a second smaller insert consisting of 72 bp of CP4 EPSPS sequence. Additionally, sequencing of soybean genomic DNA flanking the functional CP4 EPSPS insert confirmed a deletion in the E35S enhancer region. The region known to be critical for proper transcriptional initiation was not disturbed. Sequencing of the NOS 3' transcriptional termination element and the flanking plant DNA revealed that the NOS sequence is intact. An additional 250 bp segment of the CP4 EPSPS element adjacent to the 3' end of the NOS 3' transcriptional termination element was shown to be present. Since neither a promoter nor a 3' transcriptional termination element is evident within either of the small CP4 EPSPS segments, it is extremely unlikely that these regions would be transcribed. Furthermore, northern blot and western blot data show that only the expected CP4 EPSPS full-length transcript and protein are detected, respectively. These data support the conclusion that neither transcription nor translation of these CP4 EPSPS DNA segments occurs.

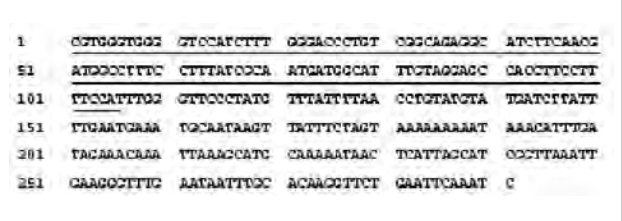


Fig. 16. 5' flanking sequence of the primary insert in soybean event 40-3-2. The underlined base pairs 1-105 (corresponding to bp 2241-2347 of PV-GMGT04, Fig. 1) represent a portion of the E35S promoter. Base pairs 106-291 represent flanking soybean genomic DNA.

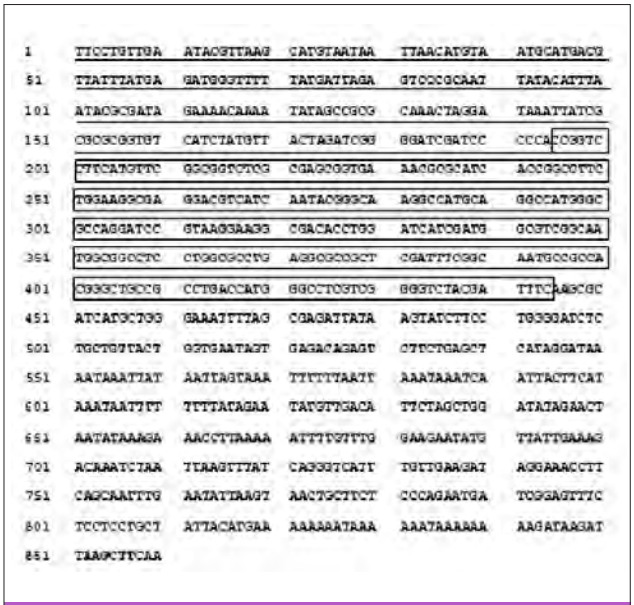


Fig. 17. 3' flanking sequence of he primary insert in soybean event 40-3-2. The underlined base pairs 1-194 (corresponding to base pairs 160-353 of PV-GMGT04, Fig. 4.1) represent the 3' portion of the NOS 3' transcriptional termination element present within the functional insert, along with 16 base pairs of plasmid PV-GMGT04 (italics) immediately adjacent to NOS. The boxed region at base pairs 195-444 (corresponding to base pairs 1490-1739 of PV-GNGT04, Fig. 1) delineates 250 bp of the CP4 EPSPS coding region. Base pairs 445-860 represent flanking soybean genomic DNA with a *Hind*III site indicated in bold letters beginning at base pair 852.

References

Dellaporta, S.L., Wood, J. & Hicks, J.B. (1983). A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Mol. Biol. Reporter* **1**, 19-21.

Kolacz, K.H. & Padgette, S.R. (1994). Molecular characterization of the 5' and 3' ends of the inserted DNA and the stability of the insert in glyphosate-tolerant soybean line 40-3-2. Monsanto Study #93-01-30-43, Monsanto Technical Report MSL-13524, St. Louis, MO.

McPherson *et al.* eds. (1991). PCR: A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford, pp. 1-13.

Mullis, K & Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335-350.

Odell, J.T., Nagy, F. & Chua, N.H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**, 810-812.

Padgette, S.R., Taylor, N.B., Nida, D.L., Bailey, M.R., MacDonald, J., Holden, L.R. & Fuchs, R.L. (1996). The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. *Journal of Nutrition* **126**, 702-716.

Re, D.B., Padgette, S.R., Delannay, X., Kolacz, K.H., Nida, D.L., Peschke, V.M., Derting, C.W., Rogers, S.G., Edwards, J.W., Barry, G.F. & Biest, N.A. (1993). Petition of determination of nonregulated status: soybeans with a Roundup Ready gene. Submitted to USDA, St. Louis.

Rogan, G.J., Dudin, Y.A., Lee, T.C., Magin, K.M., Astwood, J.D., Bhakta, N.S., Leach, J.N., Sanders, P.R. & Fuchs, R.L. (1999). Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready soybeans. *Food Control* **10**, 407-414.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Molecular Biology* **98**, 503-517.

Genetic stability of the introduced trait

The stable integration of the CP4 EPSPS gene into the genome of GTS 40-3-2 was demonstrated through a combination of molecular (*e.g.*, Southern blotting, PCR analysis, and protein expression) and phenotypic trait segregation analyses.

Southern blot analyses

Methods

Total genomic DNA was isolated from leaf tissue obtained from R3 and R6 generation plants of GTS 40-3-2 according to Dellaporta *et al.* (1983) with minor modifications. One or two leaflets from the first trifoliate leaf of greenhouse-grown plants was used as source material and an RNase incubation step followed by a phenol/chloroform extraction was added before the final ethanol precipitation. Genomic DNA was quantitated spectrophotometrically and digested with *Hind*III. Digested samples from each plant (5 μg DNA), as well as *Hind*III digested DNA from the parental A5403 line, and *Eco*RI digested PV-GMGT04 plasmid DNA (100 pg) as a positive control, were separated by 0.8% agarose-TAE gel electrophoresis. Separated fragments were transferred onto nylon membrane and probed with ^{32}P-labelled PV-GMGT01 plasmid DNA and subjected to autoradiography (Southern 1975; Sambrook *et al.* 1989).

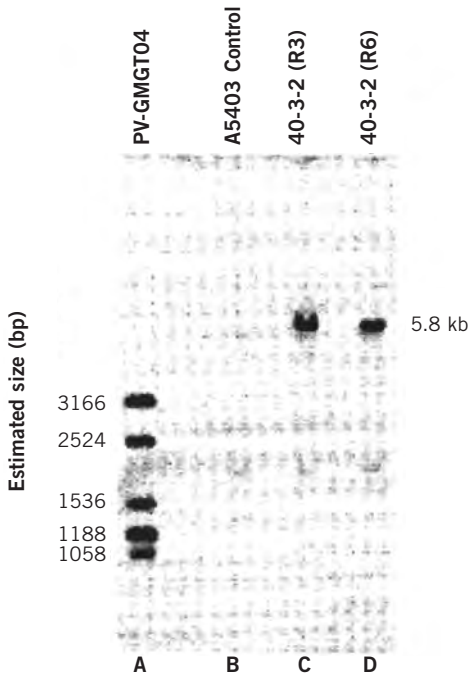


Fig. 18. Southern blot of GTS line 40-3-2 generations R3 and R6 probed with PV-GMGT04. Genomic DNA prepared from generation R3 (lane C) and R6 (lane D) plants of line GTS 40-3-2, as well as the parental non-transgenic A5403 soybean line (lane B), was digested with *Hind*III, separated by electrophoresis and transferred onto nylon membrane that was probed with 32P-labelled PV-GMGT04 plasmid DNA. As a positive control, a sample of *Eco*RI digested PV-GMGT04 DNA was included in lane A.

Results and discussion

Previous analyses using polymerase chain reaction (PCR) amplification with specific 5' and 3' terminal primers had verified the boundary regions of the inserted DNA and demonstrated that neither *Hind*III site originally present in plasmid PV-GMGT04 (at positions 155 and 2707) was incorporated into the host genome. Southern blot analysis of *Hind*III digested genomic DNA from the original transformant had demonstrated the presence of a 5.8 Kb fragment, indicating that the two *Hind*III sites bordering this fragment must be located in the plant genome, on either side of the inserted DNA

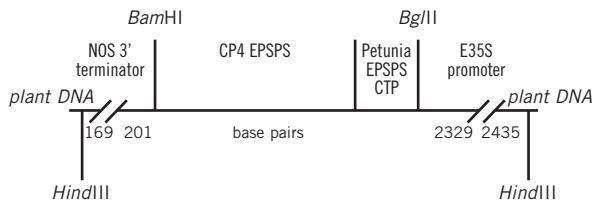


Fig. 19. Diagramatic representation of the insert contained in GTS 40-3-2 showing *Hind*III digestion sites. Based on PCR analysis of the 5' and 3' terminal regions of the inserted DNA fragment, neither *Hind*III site present at positions 155 and 2707 of plasmid PV-GMGT04 were incorporated into the host plant genome. The two *Hind*III sites bordering the 5.8 Kb fragment (Fig. 18) are located in the plant genome.

(Fig. 19). As it contains both inserted and border DNA, this fragment was considered an appropriate sentinel for monitoring the inserted DNA's stability in GTS 40-3-2.

When *Hind*III digested genomic DNA from generation R3 and R6 GTS 40-3-2 plants was probed with 32P-labelled PV-GMGT04, a single 5.8 Kb fragment was detected (Fig. 18). The fact that this same size fragment is present in both generations of 40-3-2 indicates that the plasmid DNA insert and the plant border DNA are stably maintained throughout the plant life cycle over four generations. Similar, more sensitive Southern blot analyses were also able to demonstrate the co-segregation of a second inserted DNA fragment containing a 72 bp sequence corresponding to a region from the CP4 EPSPS encoding gene. These data indicated that the primary insert and this second, smaller insert behaved as a single genetic locus.

Inheritance

Confirmation that the glyphosate tolerance trait present in GTS 40-3-2 segregates according to a defined pattern (Mendelian segregation) was obtained from the analysis of F2 progenies of backcrosses between GTS 40-3-2 and other, non-transgenic, soybean lines.

Table 3 summarizes the segregation patterns of progeny of crosses between 40-3-2 and 17 non-transgenic cultivars. A consistent 3 tolerant to 1 sensitive ratio was observed among all F2 progeny, indicating that the glyphosate tolerance in 40-3-2 is conditioned by a single dominant gene.

Conclusion

The information summarized in this section supports the conclusion that GTS 40-3-2 containing the gene encoding CP4 EPSPS is genetically stable, and that any conclusions regarding the safety of GTS 40-3-2 are also valid for its progeny and other soybean varieties derived from it through classical breeding techniques.

Table 3. Segregation of glyphosate tolerance in F_2 progeny of crosses between GTS 40-3-2 and 17 non-transgenic cultivars

Family	*Tolerant*	*Sensitive*	*Chi²*
1	17	4	0.40
2	10	2	0.44
3	12	4	0.00
4	16	4	0.27
5	16	5	0.02
6	14	3	0.49
7	18	5	0.13
8	10	4	0.10
9	17	7	0.22
10	6	3	0.33
11	15	4	0.16
12	17	1	3.63
13	10	1	1.48
14	16	5	0.02
15	3	1	0.00
16	18	3	1.29
17	19	5	0.22
Total	234	61	2.94

Uncorrected chi-square goodness-of-fit test for hypothesis of 3:1 segregation. None of the chi-square values are significant at the 95% confidence level ($chi2_{0.05}$=3.84).

References

Dellaporta, S.L., Wood, J. & Hicks, J.B. (1983). A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Mol. Biol. Reporter* **1**, 19-21.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Molecular Biology* **98**, 503-517.

Expressed material / effect

Materials and methods

Field trials

In order to generate plant material for expression and quality analysis, field trials were conducted at one site in

Puerto Rico in 1992, in nine sites across the United States during 1992, and at an additional four sites in the United States in 1993. Plots were arranged in randomized complete block designs and consisted of four genotypes: the parental control line A5403, GTS 40-3-2, as well as two additional GTS lines. Samples of leaf tissue and seeds collected from each trial site were used as test materials for determining the expressed levels of CP4 EPSPS by quantitative enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

ELISA assays

Seed and leaf tissue samples from GTS 40-3-2 and control A5403 plants were prepared for ELISA by grinding to a fine powder in liquid nitrogen and resuspending a weighed volume in extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM sodium borate, 5 mM MgCl2, 0.05% v/v Tween 20, and 0.2% sodium ascorbate) at a 1:100 tissue to buffer ratio (30 mg tissue / 3 ml buffer). The suspension was homogenized (30 sec; PT3000 Polytron), centrifuged to remove cell debris, and the supernatant either assayed immediately or stored frozen at minus 80°C. For the CP4 EPSPS ELISA, the double antibody sandwich (primary antibody from goat and secondary antibody from rabbit) was detected with donkey anti-rabbit alkaline phosphatase conjugate followed by development with p-nitrophenyl phosphate (p-NPP). The GUS direct double antibody sandwich ELISA utilized a commercially available rabbit anti-GUS antibody (CLONTECH Laboratories) and its alkaline phosphatase conjugate, with p-NPP development. Quantitation of CP4 EPSPS or GUS in plant samples was accomplished by extrapolation from the logistic curve-fits of the purified mature CP4 EPSPS (*i.e.*, without transit peptide) or GUS standard curves (both standards purified from *E. coli* overexpression strains).

Western immunoblot analysis

Samples of soybean tissue and processed soybean fractions were ground to a powder in liquid nitrogen using a mortar and pestle, and resuspended in extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM benzamidine-HCl, 5 mM DTT, 2.5 mM EDTA, 1.0 mM PMSF, 10 mM CHAPS, and 6M guanidine-HCl) at a 1:50 tissue to volume buffer ratio. Samples were homogenized with a Omni-2000 hand held homogenizer (setting 4-5; 30 sec), centrifuged to remove cell debris, and the supernatant saved for subsequent analysis. Proteins were separated by SDS-PAGE on pre-cast 4-20% linear polyacrylamide gradient gels using the buffer system of Laemmli (1970). Separated proteins were then electrophetically transferred onto PVDF membrane, treated with Tris buffered saline containing 5% non-fat dried milk powder and 0.2% Tween-20 to block non-specific protein binding sites. CP4 EPSPS protein bound to the membrane was probed using a 1:1000 dilution of goat anti-CP4 EPSPS IgG (1-2 hr at room temperature), and bound antibody was detected by incubating sequentially with biotin-labelled Protein G and horseradish peroxidase-conjugated NeutrAvidin, followed by enhanced chemiluminescence development.

CP4 EPSPS and GUS enzymatic assays

The procedure used to determine the amount of functionally active CP4 EPSPS was based on measuring the incorporation of ^{14}C into EPSPS from ^{14}C-phosphoenol pyruvate (PEP) using high pressure liquid chromatography (HPLC) separation and a radioactivity detector (Padgette *et al.* 1988; Padgette *et al.* 1987). Reactions were incubated at 25C in buffer containing 50 mM HEPES pH 7.0, 0.1 mM ammonium molybdate, 5 mM KF, 1 mM 14C-PEP, and 2 mM shikimate-3-phosphate. For analysis, samples were quenched with 100 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM sodium borate, 5 mM $MgCL_2$, 0.2% sodium ascorbate, desalted using a disposable spin-column, and separated via HPLC. One unit (U) of enzyme activity was defined a 1 micromole EPSPS produced / minute at 25°C.

The enzymatic assay for GUS was a modification of the method of Jefferson *et al.* (1986), and was based on the GUS-catalyzed formation of p-nitrophenol from p-nitrophenol-beta-D-glucuronide. Reaction mixtures (8 mM p-nitrophenyl-beta-D-glucuronide, 49 mM sodium phosphate, 10 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM EDTA, 0.1% sarkosyl, and 0.1% Triton X-100, pH 7.4) were incubated for 1 – 5 min, quenched by the addition of 2.5 M 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol, and the production of p-nitrophenol determined spectrophotometrically by measuring the absorbance at 406 nm. One unit (U) of enzyme activity was defined as 1 micromole p-nitrophenol produced / min at 37°C.

Results and discussion

Expression tests for CP4 EPSPS and GUS were performed by ELISA, and, as illustrated in Table 4, only CP4 EPSPS was detectable in either seed or leaf tissue. The mean expression levels of CP4 EPSPS were 0.288 μg/mg tissue (fresh weight) or 0.443 μg/mg tissue, respectively, for seed or leaf tissue collected from field trials during 1992. Similar, but somewhat lower levels of

Table 4. ELISA analysis of CP4 EPSPS and GUS in GTS line 40-3-2

		Ug protein / mg tissue fresh weight	
Sample[1]	***No. of sites***	***Mean***	***Range[2]***
CP4 EPSPS[3]			
Leaf[4] 1992	8	0.443	0.251-0.789
Leaf[4] 1993	3	0.415	0.299-0.601
Seed 1992	9	0.288	0.186-0.395
Seed 1993	4	0.201	0.127-0.277
GUS[3]			
Leaf[4] 1992	8	ND#	–
Seed 1992	9	ND#	–

1 All samples were frozen immediately and shipped and stored frozen. Means reported are of the site means. Soybean plant samples for ELISA were generated from nine locations in 1992 and four locations in 1993

2 Range denotes the lowest and highest individual assay for each plot.

3 No CP4 EPSPS or GUS proteins were detected in the A5403 parental control line samples (grown at identical locations) in either leaf or seed samples.

4 The center leaflet from the fully expanded third trifoliate of six plants randomly selected from different rows in various locations in each treatment plot were collected and pooled by plot.

#ND. Not detected.

expression, were measured for tissue samples collected from four field trials during 1993 (Table 4).

The ELISA results were supported by enzymatic activity assays performed on seed pools of line GTS 40-3-2 collected from the 1992 field tests. The measured glyphosate-tolerant EPSPS activity was 0.025 U/mg but no GUS enzymatic activity was detected. Neither EPSPS nor GUS enzymatic activity was detectable in seed extracts from the non-transgenic parental A5403 soybean line. The lack of detectable GUS protein or enzyme activity confirm Southern blot analyses demonstrating that GUS encoding sequences were not incorporated into the GTS 40-3-2 genome.

Western blot analysis showed that the 47 kDa CP4 EPSPS protein and no additional CP4 EPSPS immunoreactive proteins are detected in event GTS 40-3-2 (Fig. 20). The anti-CP4 EPSPS antisera used for Western blot detection showed almost no cross-reactivity with similar EPSPS proteins derived from different plant sources (Fig. 21).

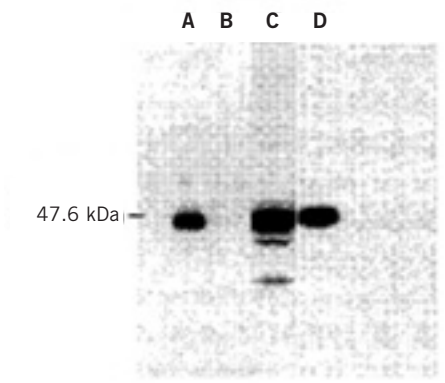


Fig. 20. Western immunoblot detection of CP4 EPSPS protein in samples of GTS 40-3-2 soybean seed (lane C) or toasted meal prepared from GTS 40-3-2 soybean seed (lane D). Purified CP4 EPSPS from an *E. coli* overexpression culture was included as a positive control (lane A), and a negative buffer control sample is shown in lane B.

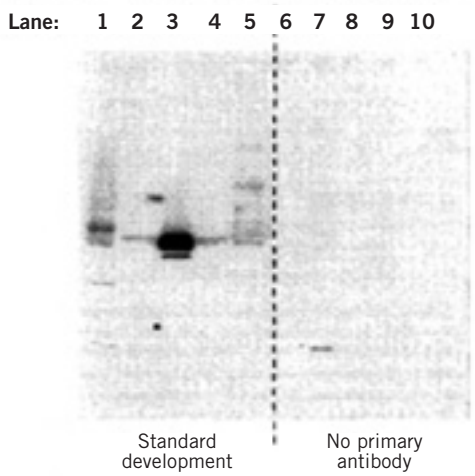


Fig. 21. Specificity of the CP4 EPSPS Western blot analytical method. All EPSPS proteins were expressed in *E. coli* and purified to near homogeneity, and the maize and petunia EPSPS proteins were loaded at 10 times the level of CP4 EPSPS. Samples tested were petunia EPSPS (50 ng; lanes 2, 8), CP4 EPSPS (5 ng; lanes 3, 9), and maize EPSPS (50 ng; lanes 4, 10). Molecular weight markers included the Promega midrange markers (lanes 1, 7) and high range colour markers (lanes 5,6; Amersham). Separated proteins were electroblotted onto PVDF membrane and either processed normally (Standard Development) or left untreated with primary antibody and otherwise processed according the standard procedure (No primary antibody).

References

Jefferson, R.A., Burgess, S.M. & Hirsch, D. (1986). Beta-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8447-8451.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* **227**, 680-685.

Padgette, S.R., Huynk, Q.K., Aykent, S., Sammons, R.D., Sikorski, J.A. & Kishore, G.M. (1988).

Identification of the reactive cysteines of *Escherichia coli* 5-enolpyruvlshikimate-3-phosphate synthase and their nonessentiality for enzymatic catalysis. *J. Biological Chemistry* **263**, 1798-1802.

Padgette, S.R., Huynh, Q.K., Borgmeyer, J., Shah, D.M., Brand, L.A., Re, D., Bishop, B.F., Rogers, S.G, Fraley, R.T. & Kishore, G.M. (1987). Bacterial expression and isolation of Petunia hybrida 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **258**, 564-573.

Assessment of possible toxicity

Due to the relatively low level of expression of CP4 EPSPS protein in GTS 40-3-2, purified CP4 EPSPS from bacterial cultures was used as test material for the acute mouse gavage and protein digestibility studies described below. This is a common practice when assessing the potential toxicity of introduced novel proteins and requires that physiochemical and functional equivalence be established between bacterial and plant expressed forms of the protein. In the case of *E. coli* expressed CP4 EPSPS (lacking the chloroplast transit peptide), functional equivalence with the plant expressed protein was based on the criteria of molecular weight, immunological cross-reactivity, absence of glycosylation, N-terminal amino acid sequence, and enzymatic activity (Table 6).

Acute mouse gavage study with CP4 EPSPS protein

Methods

An acute mouse gavage study using *E. coli* produced mature CP4 EPSPS protein (lacking the chloroplast transit peptide) was performed to directly assess the potential toxicity associated with the CP4 EPSPS protein (Naylor 1993). CP4 EPSPS protein was administered by oral gavage at dosages up to 572 mg/kg of body weight. Mice were observed twice daily for signs of toxicity and food consumption was recorded daily. Food and water were provided ad libitum. All animals were sacrificed on post-dosing day 8 and 9 and subjected to gross necropsy. Approximately 40 tissues were collected and saved from each animal in the test.

Results and discussion

The results from this study demonstrated that there were no adverse effects on mice administered the CP4 EPSPS protein by oral gavage at dosages up to 572 mg/kg. The dose represented an approximate 1300-fold safety margin relative to the highest potential human consumption of plant-expressed CP4 EPSPS, assuming no loss of protein due to processing. There were no statistically significant differences in body weight, cumulative body weight, or food consumption between the vehicle or bovine serum albumin protein control groups and CP4 EPSPS protein-treated groups.

Digestion of CP4 EPSPS in simulated gastric and intestinal fluids

Methods

Simulated mammalian gastric and intestinal digestive fluids were used in in vitro assays to assess the susceptibility of *E. coli* expressed CP4 EPSPS to proteolytic degradation. Simulated gastric and intestinal fluids were prepared as described in the United States Pharmacopeia (US Pharmacopeia 1990), a frequently cited reference for *in vitro* digestion studies. *In vitro*

Table 6. Summary of equivalence analyses: GTS *vs. E. coli* CP4 EPSPS proteins

Analytical Method	*Criteria*	*Results*
SDS-PAGE	Similar electrophoretic mobility.	Similar apparent MW.
Western immunoblot	Similar electrophoretic mobility and immunological response.	Similar apparent MW and immunological response.
Glycosylation	Comparable response with glycosylation detection.	No CP4 EPSPS specific carbohydrate moieties detected.
Amino Acid Sequence	Corresponds through 10 amino acid positions.	Correct N-terminus through 15 positions (N-terminal methionine present on *E. coli* produced CP4 EPSPS).
CP4 EPSPS Enzymatic Activity	Specific activities (SA) will not differ more than a factor of 2.	GTS 3.9 U/mg *E. coli* 3.0 U/mg.
ELISA	Comparable done response.	Dose response curves comparable.

digestive fate of CP4 EPSPS was monitored using Western immunblot analysis and by measuring enzymatic activity of aliquots removed at various times following the start of digestion.

Results and discussion

CP4 EPSPS was rapidly degraded in both simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF) with a half-life of less than 15 seconds or less than 10 minutes, respectively. To put the rapid *in vitro* degradation of the CP4 EPSPS protein into perspective, solid food has been estimated to empty from the human stomach by about 50% in two hours, while liquid empties 50% in approximately 25 minutes (Sleisenger & Fordtran 1989). If some of the CP4 EPSPS protein did survive the gastric system, it would be rapidly degraded by intestinal proteases. The transit time through the intestine (for 51Cr-labelled chromate, which is not absorbed) has been estimated to be 4-10 hours for the first products to appear in the feces and 68-165 hours for the last to be detected. Thus the T_{50} of 10 minutes for the in vitro degradation of CP4 EPSPS provides a wide margin of assurance that virtually all of the protein would be degraded during its initial transit through the intestinal tract.

Lack of homology of CP4 EPSPS protein with other protein toxins

The deduced (predicted) amino acid sequence of the CP4 EPSPS was compared with the sequences of 1935 known protein toxins present in the Pir protein, Swissprot, and Genpept protein databases. The analysis of homology of CP4 EPSPS protein to known protein toxins was based on the fact that patterns of amino acid sequence or regions of strong homology shared between two or more proteins may provide insight into the biological activity of the protein. Homologous proteins derived from a common ancestor have similar amino acid sequences, are structurally similar and often share common function. Homology was determined by comparing the degree of amino acid sequence similarity between proteins using published criteria (Doolittle 1990). There were no detected homologies with known toxins. The lack of significance between the alignments was assessed by randomizing the CP4 EPSPS amino acid sequence, keeping relative proportions of individual amino acids the same, and comparing the randomized sequence with the identical database of known protein toxins. The output comparisons generated in this manner closely resembled the results obtained with the unrandomized CP4 EPSPS sequence.

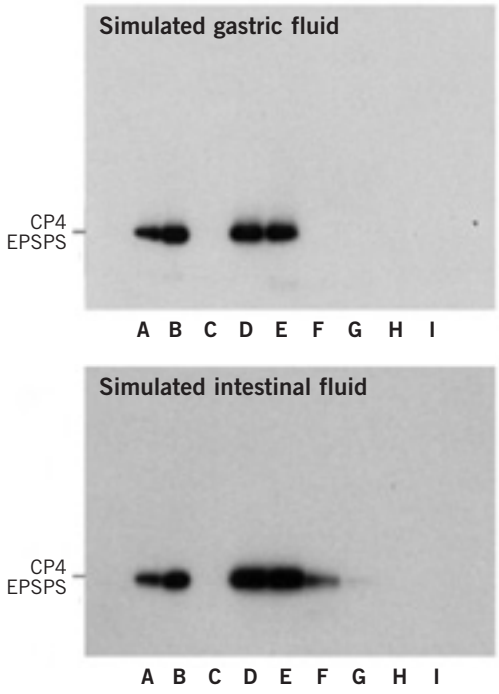


Fig. 33. *In vitro* digestibility of *E. coli* expressed CP4 EPSPS in either simulated gastric fluid (top panel) or simulated intestinal fluid (bottom panel). Aliquots were removed at 0, 15, 30, 60, and 120 seconds after the start of digestion with SGF (lanes E through I, top panel), or at 0, 10, 32, 100, and 270 minutes after the start of digestion with SIF (lanes E through I, bottom panel) and subjected to SDS-PAGE. Separated proteins were electroblotted onto PVDF membrane and treated sequentially with rabbit anti-CP4 EPSPS IgG and 125IProtein G. Samples of purified CP4 EPSPS (5, 10 ng in lanes A, B, respectively), buffer control (lane C), and CP4 EPSPS in reaction buffer w/o digestive enzymes (lane D) were included on each gel.

Conclusion

In summary, the CP4 EPSPS protein shows no amino acid sequence similarity to known protein toxins, is rapidly degraded in vitro under conditions simulating the digestive conditions in the mammalian stomach or intestinal tract, and displays no indications of acute toxicity as measured by treatment-related adverse effects in mice administered CP4 EPSPS protein by oral gavage.

References

Doerfler, W. & Schubbert, R. (1997). Fremde DNA im Saugersystem. *Deutsches Arzteblatt* **94**, 51-52.

Doolittle, R.F. (1990). Searching through sequence databases. *In*: Molecular Evolution: Computer Analysis of Protein and Nucleic Acid Sequences. Doolittle, R.F. (ed.). Pp. 99-110. Academic Press, San Diego, CA.

Naylor, M. (1993). Acute oral toxicity study of CP4 EPSPS in albino mice. Monsanto Report ML92542, St. Louis, MO.

OECD (2000). Report of the task force for the safety of novel foods and feeds. C(2000)86/ADD1 Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.

Sleisenger, M.H. & Fordtran, J.S. (1989). Gastrointestinal Disease. Volume 1, Pathophysiology Diagnosis Management. 4th Edition. W.B. Saunders Co., Toronto. pp 685-689.

US Pharmacopeia (1990). Vol. XXI, NF XVII. United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD. 1788 pp.

Assessment of possible allergenicity

The potential allergenicity of the CP4 EPSPS protein expressed in transgenic GTS 40-3-2 soybeans was assessed by examining: (1) the immunoreactivity of separated soybean proteins with IgE antibodies from sera obtained from soybean allergic individuals; (2) the physiochemical properties of CP4 EPSPS in relation to known allergenic proteins; (3) the lability of CP4 EPSPS in simulated gastric and intestinal fluids; (4) amino acid sequence similarities with other naturally occurring plant derived EPSPS enzymes and with known protein allergens; and (5) estimated dietary exposure to CP4 EPSPS based on its concentration in food.

Immunoreactivity with sera from sensitized individuals

Protein extracts were prepared from non-toasted, defatted soy flour derived from GTS 40-3-2, the parental A5403 line, and three commercially available soy flour preparations, and separated by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Separated proteins were electroblotted onto PVDF membranes and probed with IgE antibodies from pooled serum obtained from several individuals shown to be sensitive to soybean products by direct food challenges (Burks *et al.* 1988). As controls, IgE antibodies from normal and peanut-sensitive individuals were used to test the specificity of similar antibodies from soybean-sensitive individuals.

Both the presence and the relative levels of the endogenous allergenic proteins in all of these soybean preparations were comparable, demonstrating that the profile of allergenic proteins was not significantly altered during the production of GTS 40-3-2.

Physiochemical properties of CP4 EPSPS

Although the molecular mass of CP4 EPSPS, 47.6 kDa, is within the size range of 10-70 kDa reported for many allergenic proteins, its other physiochemical properties are not consistent with the characteristics of most allergenic proteins. CP4 EPSPS is not heat stable and all detectable enzymatic activity and tertiary structure are lost (established by loss of ELISA reactivity) after the toasting step during processing (Padgette *et al.* 1993). This instability of CP4 EPSPS during processing was expected based on the rapid loss of activity observed with the purified protein upon heat treatment (65C, 15 minutes).

As most protein allergens are glycosylated, the plant-expressed CP4 EPSPS protein was examined for the presence of carbohydrate moieties, and found not to be glycosylated (Harrison *et al.* 1993). This result was expected since protein glycosylation requires passage through the rough endoplasmic reticulum and Golgi bodies, which requires specific targeting sequences on the N-terminus of the protein that were not engineered into the CP4 EPSPS construct. The CP4 EPSPS gene product was targeted to the chloroplast, the site of aromatic amino acid biosynthesis, and this targeting does not require or enable glycosylation.

Stability to *in vitro* digestion

The ability of food allergens to reach and to cross the mucosal membrane of the intestine, and thus enter the circulatory system, is a likely prerequisite to allergenicity. A protein that is stable to the acid-protease and proteolytic conditions of the stomach and intestine, respectively, has an increased probability of reaching the intestinal mucosa. Many allergenic proteins exhibit proteolytic stability (King *et al.* 1967; Kortekangas-Savolainen *et al.* 1993; Onaderra *et al.* 1994; Taylor 1992; Taylor *et al.* 1987; Metcalfe 1985), although the majority remain untested.

As has already been discussed in Chapter 9 (Toxicity), the CP4 EPSPS protein was extremely

susceptible to degradation (Ream *et al.* 1993) in both simulated gastric fluids (*e.g.*, pepsin digestion; T50 < 15 seconds) and simulated intestinal fluids (*e.g.*, trypsin digestion; T50 < 10 minutes). This lability to digestion by proteases present in the mammalian digestive tract is not a feature of most protein allergens, and provides additional evidence supporting the lack of allergenic potential for CP4 EPSPS.

Amino acid sequence analysis

The predicted amino acid sequence of the CP4 EPSPS protein was compared with the amino acid sequences of 121 known allergenic proteins contained in three protein databases (Genpept, Pir protein, and Swissprot) using the FASTA computer program (Pearson & Lipman 1988). No biologically significant homology (Doolittle 1990) and, based on an epitope size of 8 contiguous amino acids, no immunologically significant sequence similarities were observed with allergens.

Prevalence in food

A significant factor contributing to the allergenic potential of food proteins is their concentration in foods. Most allergens are present as major protein components in the specific food, in amounts ranging from 1-80% of the total protein (Fuchs & Astwood 1996). This is true for the allergens in milk (Taylor *et al.* 1987), soybean (Burks *et al.* 1988), and peanuts (Barnett *et al.* 1983). In contrast, the CP4 EPSPS is present in very low levels in soybean seed (0.03% fresh weight, or 0.08% of the total protein).

Conclusion

In summary, the data and analyses described above and summarized in Table 7 support the conclusion that the CP4 EPSPS protein is not derived from an allergenic source, does not possess immunologically relevant sequence similarity with known allergens, and does not possess the characteristics of known protein allergens. This information, coupled with the extremely rapid digestion of this protein under in vitro digestive conditions that mimic human digestion, established that there is no reason to believe that plant expressed CP4 EPSPS protein should pose any significant allergenic risk for consumption of the products generated from GTS 40-3-2 soybeans.

Table 7. Characteristics of known protein allergens[1]

Characteristic	*Allergens*	*CP4 EPSPS*
Allergenic source of gene	yes	no
Mol wt 10-70 kDa	yes	yes
Glycosylated	yes[2]	no
Similar sequence to allergens	yes	no
Stable to digestion	yes	no
Stable to processing	yes	no
Prevalent protein in food	yes	no

1. As described in Taylor (1992) and Taylor et al. *(1987).*
2. Typically, but not absolutely.

References

Anderson, J.A. (1996). Allergic reactions to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36**, S19-S38.

Barnett, D., Baldo, B.A. & Howden, M.E.H. (1983). Multiplicity of allergens in peanuts. *J. Allergy Clin. Immunol.* **72**, 61-68.

Bock, S. A. (1987). Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first three years of life. *Paediatrics* **79**, 683-688.

Burks, A.W., Brooks, J.R. & Sampson, H.A. (1988). Allergenicity of major component proteins of soybean determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.* **81**, 1135-1142.

Burks, A.W. & Sampson, H. (1993). Food allergies in children. *Current Problems in Paediatrics* **23**, 230-252.

Doolittle, R.F. (1990). Searching through sequence databases. *Methods in Enzymology* **183**, 99-110.

Fuchs, R.L. & Astwood, J.D. (1996). Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. *Food Technology* **50**, 83-88.

Harrison, L.A., Bailey, M.R., Leimgruber, R.M., Smith, C.E., Nida, D.L., Taylor, M.L. & Padgette, S.R. (1993). Equivalence of plant- and microbially-expressed proteins: CP4 EPSPS from glyphosate-tolerant soybeans and *E. coli.* Monsanto Study 92-01-30-11, Monsanto Technical Report MSL-12899, St. Louis, MO.

Hefle, S.L., Nordlee, J. A. & Taylor, S. L. (1996): Allergenic foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36**, S69-S89.

King, T.P., Norman, P.S. & Connell, J.J. (1967). Isolation and characterization of allergens from ragweed pollen, IV. *Biochemistry* **6**, 1992-2000.

Kortekangas-Savolainen, O., Savolainen, J. & Einarsson, R. (1993). Gastrointestinal stability of baker's yeast allergens: an *in vitro* study. *Clin. Exp. Allergy* **23**, 587-590.

Mekori, Y. A. (1996). Introduction to allergic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36**, S1-S18.

Metcalfe, D.D. (1985). Food allergens. *Clin. Rev. Allergy* **3**, 331-349.

Metcalfe, D.D., Astwood, J. D., Townsend, R., Sampson, H. A., Taylor, S. L. & Fuchs, R. L. (1996). Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36**, S165-S186.

Onaderra, M., Monsalve, R.I., Mancheno, J.M., Villalba, M., Martinez Del Pozo, A., Gavilanes, G. & Rodriguez, R. (1994). Food mustard allergen interaction with phospholipid vesicles. *Eur. J. of Biochem.* **225**, 609-615.

Padgette, S.R., Nida, D.L., Biest, N.A., Bailey, M.R. & Zobel, J.F. (1993). Glyphosate tolerant soybeans in the U.S. in 1992: Field test, processing studies, and analytical evaluation. Monsanto Study 92-01-30-02, Technical Report MSL-12906, St. Louis, MO.

Parker, S. L., Leznoff, A., Sussman, G. L., Tarlo, S. M. & Krondl, M. (1990). Characteristics of patients with food-related complaints. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **86**, 503-511.

Pearson, W. & Lipman, D. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2444-2448.

Ream, J.E., Bailey, M.R., Leach, J.N. & Padgette, S.R. (1993). Assessment of the in vitro digestive fate of CP4 EPSP synthase. Monsanto Study 92-01-30-15, Technical Report MSL-12949, St. Louis, MO.

Sampson, H. A. (1990). Immunologic mechanisms in adverse reactions to foods. *Immunology and Allergy Clinics of North America* **11**, 701-706.

Sampson, H. A. & Burkes, A. W. (1996). Mechanisms of food allergy. *Annual Review of Nutrition* **16**, 161-177.

Taylor, S.L. (1992). Chemistry and detection of food allergens. *Food Technol.* **39**, 146-152.

Taylor, S.L., Lemanske Jr., R.F., Bush, R.K. & Busse, W.W. (1987). Food allergens: Structure and immunologic properties. *Ann. Allergy* **59**, 93-99.

Compositional analyses of key components, evaluation of metabolites, food processing and nutritional modification

Nutrition data were obtained from analyses of glyphosate-tolerant and control soybeans (parental variety A5403) grown at nine field locations in 1992. These sites were chosen to be representative of the wide geographical area in which soybeans are grown. In addition, a four-site field test with limited analytical evaluations was performed in 1993. As the emphasis of these analyses was to examine any effects of the introduced gene and protein, the test material was derived from soybeans that had not been treated with glyphosate herbicide.

Although many of the analyses were performed on soybean seed, several soy protein products were also manufactured from GTS 40-3-2 for additional testing. Toasted meal was chosen because it is the main soybean protein product used in animal feed, defatted meal (flour) was prepared because it is the starting material for a large number of soybean products used in food, and protein concentrate from defatted meal was also evaluated because of its food use. In addition, crude lecithin and refined, bleached deodorized oil were manufactured.

Proximate analysis

Compositional (proximate) analyses were performed on soybean seeds derived from GTS 40-3-2 and the parental non-transgenic control line, A5403. The concentrations of carbohydrate, protein, fat, moisture, fibre, and ash, expressed on a dry-weight basis, were measured according to published procedures of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC).

Methods

Ash

Volatile organic matter was driven off when the sample was ignited at 550°C in an electric furnace. The residue was quantitated gravimetrically and calculated to determine percent ash (AOAC method 923.03, 1990). Using a 3 g sample, the lowest confidence level of this method was 0.2%.

Carbohydrates

Carbohydrates were calculated by difference using the fresh weight-derived data and the following equation (USDA Agricultural Handbook No. 8, 1975):

% carbohydrates =
100% - (% protein + % fat + % ash + % moisture)

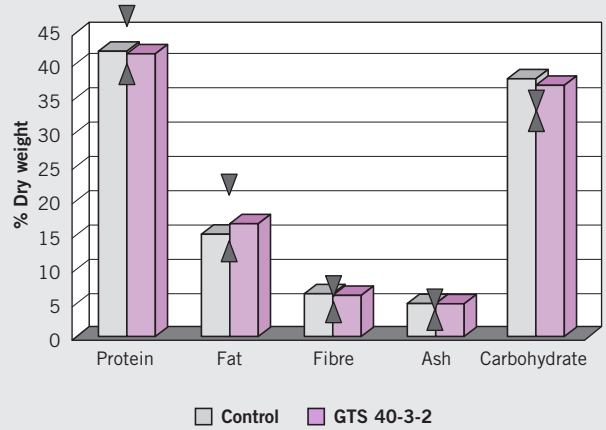


Fig. 22. Proximate analysis of soybean seeds. Bars represent the means of seeds from nine field sites, and the triangles represent the high and low values reported in the literature for each respective component.

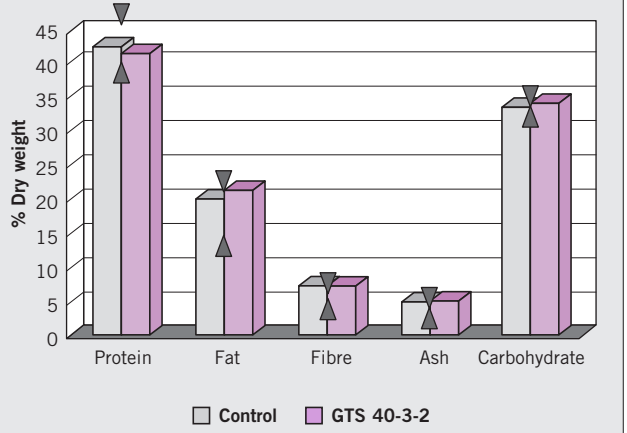


Fig. 23. Proximate analysis of soybean seeds. Bars represent the means of seeds collected from four field sites in 1993, and the triangles represent the high and low values reported in the literature for each respective component.
Similar analyses performed on samples of toasted (Fig. 24) and non-toasted meal, and protein concentrate prepared from GTS 40-3-2 and control non-transgenic soybeans did not reveal any appreciable differences in the levels of macronutrients.

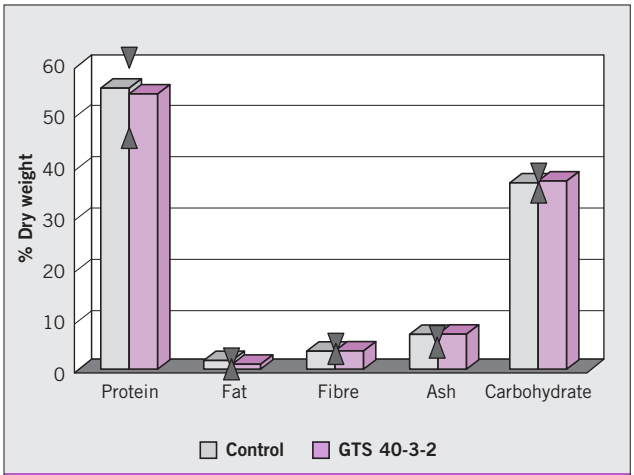


Fig. 24. Proximate analysis of toasted meal. Bars represent the means of three processing studies, and the triangles represent the high and low values from the literature for each respective component.

Crude Fibre

Crude fibre is the loss on ignition of dried residue remaining after digestion of the samples with 1.25% sulfuric acid and 1.25% sodium hydroxide solutions under specific conditions (AOAC method 7.066-7.070, 1984). Using a 2 g sample, the lowest confidence level of this method was 0.2%.

Fat

The fat was extracted using ether and hexane. The extract was washed with a dilute alkali solution and filtered through a sodium sulfate column. The remaining extract was evaporated, dried and weighed (AOAC methods 920.39C). Using a 2 g sample, the lowest confidence level of this method was 0.1% fat.

Moisture

The sample was dried to a constant weight in a vacuum oven at 133°C (approximately 2 hours) (AOAC method 44-15A, 1987). The moisture loss was determined gravimetrically.

Protein

Protein and other organic nitrogen in the sample were converted to ammonium sulfate by digesting the sample with sulfuric acid containing a potassium sulfate/titanium dioxide/cupric sulfate catalyst mixture. The acid digest was made alkaline, and the ammonia was distilled and titrated with standard acid. The percent nitrogen was determined and converted to protein using the factor 6.25 (AOAC method 988.05, 1990). Using a 1 g sample, the lowest confidence level of this method was 0.1% protein (0.02% nitrogen).

Results

Compositional analyses of protein, fat, fibre, ash, and carbohydrate of GTS 40-3-2 and control soybean seeds obtained from nine field trial sites in 1992 and four trial sites in 1993 are presented in Figures 22 and 23, respectively. For each of the components measured, there were no statistically significant differences between GTS 40-3-2 and control soybeans, and with the exception of total carbohydrate, the measured values were within the range reported in the scientific literature. For the nine-

site study, the mean GTS 40-3-2 seed carbohydrate content was 37.1% dry weight, compared to a literature high of 34%. This difference was not judged as significant from a safety perspective as the mean carbohydrate concentration measured in control soybeans harvested from the same sites was 38.1% dry weight.

Similar analyses performed on samples of toasted (Fig. 24) and non-toasted meal, and protein concentrate prepared from GTS 40-3-2 and control non-transgenic soybeans did not reveal any appreciable differences in the levels of macronutrients.

Amino acid composition

Methods

Seed samples were subjected to acid hydrolysis using 6N HCl, then adjusted to pH 2.2 and the individual amino acids were quantitated using an automated amino acid analyzer equipped with post-column ninhydrin derivatization and colorimetric detection (Moore & Stein 1954).

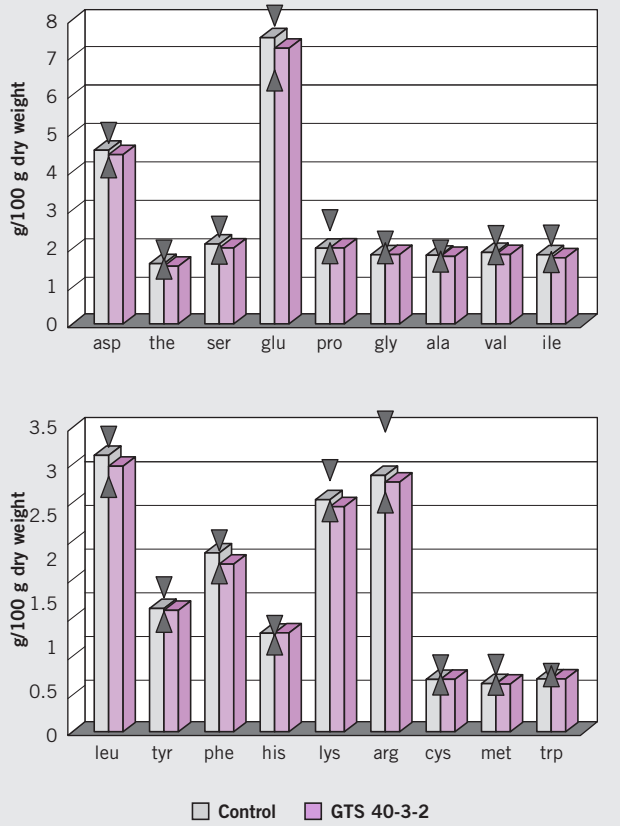


Fig. 25. Amino acid analysis of soybean seeds. Bars represent the mean concentrations of individual amino acids present in samples from soybean seeds harvested from nine field trials during 1992. The triangles represent the high and low values reported in the literature. Several literature values were calculated by converting g amino acid / 100 g protein to g amino acid / 100 g sample by using the mean protein concentration of the seeds analyzed, 41.5%.

Results

For the 18 amino acids measured, there were no statistically significant differences in the levels of any amino acid, including aromatic amino acids, between GTS 40-3-2 seeds and control non-transgenic soybean seeds.

The shikimate pathway plays a central role in plant metabolism and it has been estimated that about one-fifth of the carbon fixed by plants is subsequently channelled through this pathway (Haslam 1993). The lack of any difference in the levels of aromatic amino acids between transgenic GTS soybean seeds and non-transgenic seeds is supported by the fact that all available evidence suggests that EPSPS is not a rate-limiting step in the shikimate pathway, but that regulation of this pathway occurs at the first step in the conversion of erythrose 4-phosphate to 2-keto-3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phospate (DAHP) by DAPH synthase (Weiss & Edwards 1980). Increased EPSPS activity would not, therefore, be expected to increase the levels of aromatic compounds in plants, and it has been observed that plant cells expressing 40-times more EPSPS than wild-type cultures do not overproduce aromatic amino acids (Smart *et al.* 1985).

Fatty acid composition

Methods

Samples of soybean seed or refined soybean oil were extracted with chloroform/methanol, saponified with alcoholic potassium hydroxide, and the free fatty acids were then extracted with hexane, washed with water and dried with sodium sulfate. Fatty acids were esterified with methanol, using boron trifluoride as a catalyst, taken up in heptane and subjected to gas chromatographic analysis (AOAC method 983.23 1990). The percent abundance of individual fatty acid methyl esters was calculated relative to the total amount of fatty acid methyl esters present. The lowest confidence level of this method was 0.1% of an individual fatty acid methyl ester.

Results

The relative abundances of individual fatty acids were determined for samples of soybean seed and refined,

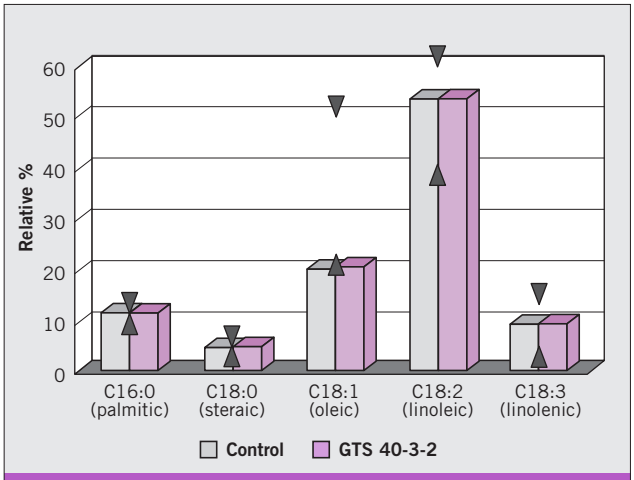


Fig. 26. Fatty acid analysis of soybean seeds. Bars represent the mean levels of individual fatty acids determined from seeds from nine field trial sites in the United States in 1992. The triangles represent the high and low values from the literature for each respective fatty acid.

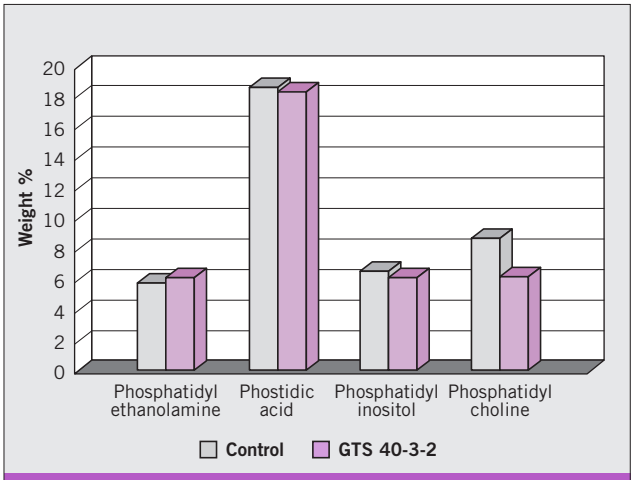


Fig. 27. Crude lecithin analysis of refined, bleached, deodorized soybean oil prepared from soybean seeds harvested from 4 field trial locations in the United States in 1993. Literature values were not available for the components of this crude lecithin fraction.

bleached, deodorized oil derived from GTS 40-3-2 and control non-transgenic soybeans (Fig. 26). There was only one statistically significant difference in the seed fatty acid composition between GTS 40-3-2 and control soybeans; this was for C22:0 fatty acids, which represent less than 0.6% of the total fatty acid fraction. All values, even those for C22:0 from seeds, were within the normal range of values for each respective fatty acid as reported in the literature.

Lecithin, which is a phosphatide removed from crude soybean oil, is used as a natural emulsifier, lubricant, and stabilizing agent (Waggle & Kolar, 1979). In addition to analysis of the free fatty acid profile of refined, bleached, deodorized soybean oil prepared from GTS 40-3-2 and non-transgenic soybeans, these oil samples were used to prepare crude lecithin fractions that were analyzed for phosphatide composition (phosphatidyl ethanolamine, phostidic acid, phosphatidyl inositol, phosphatidyl choline) (AOAC method Ja 7b-91). The relative abundance of each of these phosphatide components was comparable between crude lecithin fractions prepared from GTS 40-3-3 soybean oil and control non-transgenic soybean oil.

Soybean seed proteins

The profiles of seed storage proteins extracted from GTS 40-3-2 and control non-transgenic soybean seeds were compared by sodium dodecylsulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). There were no discernable differences between transgenic and control soybeans (Fig. 28), which indicates that the gross

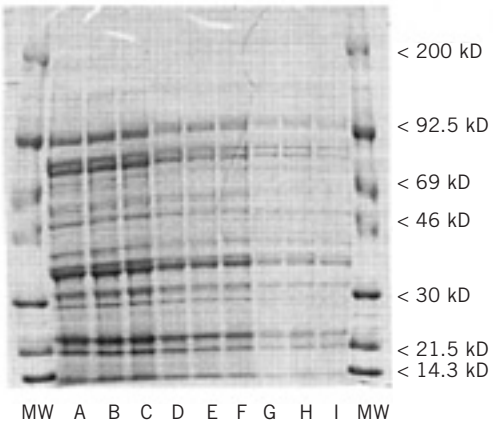


Fig. 28. Coomassie blue stained SDS-PAGE of soybean seed proteins. Composite seed samples from GTS 40-3-2 (lanes B, E, H), control non-transgenic line A5403 (lanes A, D, G), and an additional GTS line 61-67-1 (lanes C, F, I) were extracted, denatured with SDS and 1% 2-mercaptoethanol, and subjected to SDS-PAGE on a 4-20% gradient of polyacrylamide. Aliquots representing 25, 12, or 6.25 ug protein were loaded in each of three lanes, for each soybean sample.

protein compositions of GTS 40-3-2 seeds are not materially different from that of the control soybeans.

Levels of antinutrients

Soybean is naturally a source of several compounds that have been associated with antinutritive effects. These include protease inhibitors, such as soybean trypsin inhibitor, lectins (*e.g.*, soybean hemagglutinin),

isoflavones, and phytate, which complexes with inorganic phosphorous in seed but can also sequester other metallic ions such as iron, calcium, zinc, and magnesium, rendering these elements nutritionally unavailable. The levels of these antinutrient factors were determined in samples of GTS 40-3-2 soybean seed, as well as toasted soybean meal used for livestock feed, and compared with the levels found in the parental non-transgenic soybean line.

Trypsin inhibitors

The antinutritive effect of trypsin inhibitors in unheated soybean products has been the subject of much research (Rackis *et al.*, 1986). The destruction of trypsin inhibitors and consequent elimination of hypertrophic pancreas effects is an important step in the processing of raw soybeans into products with excellent protein quality (Anderson *et al.* 1979).

Trypsin inhibitory activity was measured on alkaline (pH 9.5 - 9.8) extracts of raw soybean seed, or toasted meal, by incubation with a known concentration of trypsin, followed by the addition of benzoyl-D-arginine-p-nitroanilide (BAPNA). Measurements of the absorbance at 410 nm were taken after 10 minutes of reaction. Uninhibited trypsin catalyzes the hydrolysis of BAPNA, forming a yellow-coloured p-nitroaniline. One trypsin unit was defined as an increase equal to 0.01 absorbance units at 410 after 10 minutes per 10 ml reaction volume. The lowest confidence level of this method was 1 trypsin inhibitor unit (TIU) / mg sample, using a 1 g sample.

In comparing extracts of raw soybean seeds from GTS 40-3-2 and non-transgenic control lines (Fig. 29), there were no statistically significant differences in trypsin inhibitor activity. The normal processing of soybean meal to produce toasted meal results in a greater than 90% elimination of trypsin inhibitor activity from both GTS 40-3-2 and control material (Fig. 8.9).

Lectin analysis

Plant lectins are a class of proteins with specific binding affinities for carbohydrate containing glycoproteins that are usually present in plant cell walls and the plasma membrane of cells. The binding of lectins to cell surface glycoproteins may cause agglutination, mitosis, or other biochemical changes in the cell. The ingestion of lectins, such as soybean hemagglutinin, has been associated with a range of antinutritive effects and some disease pathologies. Soybean lectin has been quoted as being responsible for about 25% of the growth inhibition attributable to the ingestion of raw soybean meal by rats (Leiner 1953), although it has since been concluded by some that soybean agglutinin does not play any major role as a determinant of the nutritional quality of soybean protein (Leiner 1980). Other authors still believe that circumstantial evidence exists that soybean lectin may make an appreciable contribution to observed growth inhibition caused by dietary exposure to uncooked soybean meal (Pusztai 1989).

The levels of soybean lectin in raw and toasted soybean meal were estimated by measuring the hemagglutination activity of various extracts against

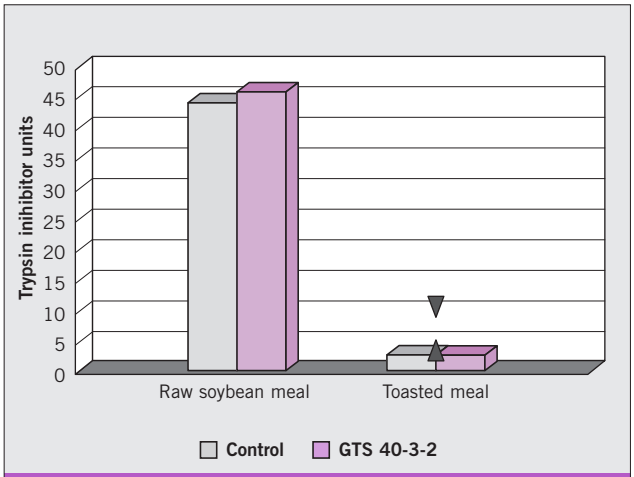


Fig. 29. Trypsin inhibitor activity of raw and toasted soybean meal. Bars represent the results of duplicate studies, and the triangles represent the high and low values for trypsin inhibitor activity reported in the literature for toasted soybean meal.

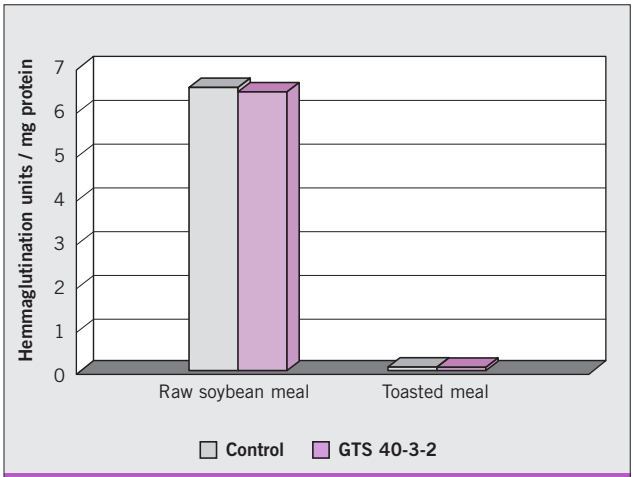


Fig. 30. Soybean lectin analysis of raw and toasted soybean meal. Bars represent the mean values obtained using composite samples of soybeans harvested from nine field trials during 1992. Values are expressed as hemagglutination units (HU) / mg protein.

rabbit red blood cells (Leiner, 1955; Klurfeld & Dritchevski, 1987). There were no statistically significant differences in the lectin activity between GTS 40-3-2 and control non-transgenic soybeans. The level of hemagglutination activity in raw soybean meal was less than 7 hemagglutination units (HU) / mg protein and essentially undetectable in samples of toasted meal (Fig. 30). A comparison of the hemagglutinin activity observed for raw meal in these tests with previously published values of 60-426 HU / mg protein was not informative due to the variability in red cell lots. The sensitivity of the assay was established in positive control tests with purified soybean lectin, in which values of 461-541 HU / mg protein were measured.

Isoflavone analysis

The isoflavones genistein, daidzein, and coumestrol are naturally present in soybeans and their ingestion has been linked to a number of biochemical effects in mammalian species, including estrogenic and hypocholesterolemic activities (Wang *et al.* 1990; Murphy 1982). They have also been reported to contribute to deleterious effects on livestock animals fed soybean meal (Setchell *et al.* 1987).

The bound and free forms of daidzein and genistein were determined in samples of raw and toasted soybean meal by high pressure liquid chromatography (HPLC) separation (Pettersson & Kiessling, 1984). Sample extracts, and extracts following acid hydrolysis to liberate bound isoflavones, were analyzed to calculate the concentrations of free and total isoflavones, respectively. Concentrations of bound isoflavones were calculated as the difference of these two values.

No statistically significant differences in the levels of any isoflavones measured in either raw or toasted soybean meal were detected between GTS 40-3-2 and non-transgenic control soybeans (Fig. 31). The large variability observed in values determined for seeds harvested from different field trial sites was attributed to the effect of environmental variability on the formation of these compounds in plants.

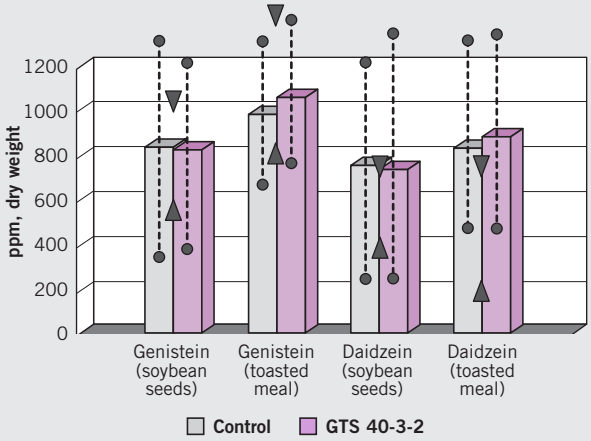


Fig. 31. Genistein and daidzein analysis of soybean seed and toasted meal. For isoflavone levels in soybean seeds, the bars represent the means of values obtained from seed harvested from nine field trial sites in 1992, and in the case of toasted meal, the bars represent the means of three processing studies. The thin lines represent the ranges of experimentally determined values and the literature high and low values in each case are indicated by the triangles.

Stachyose, raffinose, and phytate analysis of soybean meal

The low molecular weight carbohydrates, stachyose and raffinose, are primarily responsible for flatus activity, which is a well known characteristic of soybean products (Rackis 1976). Phytic acid (phytate) is a hexaphosphoric acid derivative of inositol, and exists mainly in soybean seeds as an insoluble, non-nutritionally available calcium-magnesium-potassium complex (Mohamed *et al.* 1991). Phytate is not broken down in monogastric animals (*e.g.*, poultry, fish, swine) and is the main reason that livestock feeds for these animals must be supplemented with additional phosphorus and other minerals, or with phytase enzyme to degrade phytate.

The levels of stachyose and raffinose in extracts prepared from toasted soybean meal were determined by HPLC (Dunmire & Otto 1979). Phytic acid was

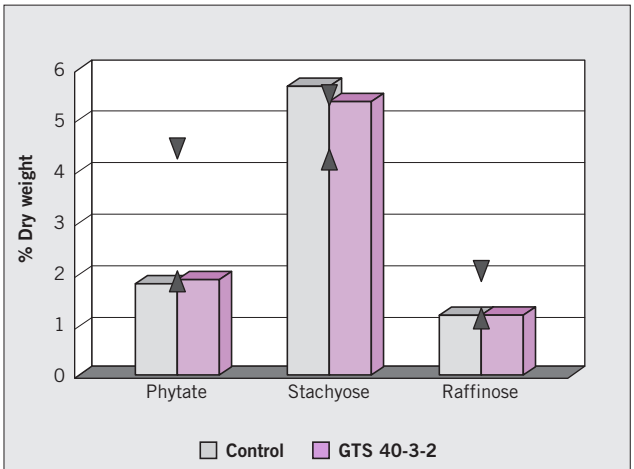


Fig. 32. Phytate, stachyose, and raffinose analysis of toasted meal. Bars represent the means of three processing studies, and the triangles represent the high and low values from the literature for each component.

extracted with dilute HCl and separated from inorganic phosphates by anion exchange chromatography (Ellis & Morris 1983). Bound phytate was eluted with NaCl solution and digested with a mixture of sulfuric and nitric acid to liberate free phosphate, which was quantitated spectrophotometrically following reaction with ammonium molybdate and sulfonic acid. Values were converted to phytic acid based on molecular weight equivalence and the lowest confidence level of the assay was 0.028% phytic acid based on a 2 g sample.

There were no statistically significant differences in the respective levels of stachyose, raffinose, or phytate measured in samples of toasted meal prepared from GTS 40-3-2 or non-transgenic control soybeans (Fig. 32).

Nutrient bioavailability - confirmatory animal feeding studies

In order to establish that the genetic modification resulting in GTS 40-3-2 did not adversely affect the wholesomeness (ability to support typical growth and well-being) of soybean products, animal feeding studies were performed with laboratory rats, broiler chickens, catfish, and dairy cows. Both processed and unprocessed soybean meal was tested on rats because the majority of soybeans used for human food and animal feed are processed by heat treatment, and because rats serve as a surrogate for wild mammals that may eat soybeans in the field. Poultry consume about 49% of the soybeans fed to farm animals and were the subject of a six-week growth study, and dairy cows were included in a four week study since ruminants are normally fed raw soybeans as a source of protein. The catfish study was included since soybean meal is used in diets for commercial aquaculture. Lastly, unprocessed soybean meal was fed for 5 days to bobwhite quail, since birds may feed on soybeans left in the field after harvest.

Methods

Rat Four-Week Feeding Study

Eight week old male and female Charles River CD rats were fed rodent chow containing either processed or unprocessed soybean meal from GTS 40-3-2 or control non-transgenic soybeans for four weeks, ad libitum, at substitution levels of 24.8% or up to 10%, respectively. Feed consumption and body weight were measured at weekly intervals, and rats were observed twice daily for mortality and adverse clinical signs. At the end of the study, all test animals were sacrificed and necropsied. Liver, testes, and kidneys were weighed and approximately 40 tissues were collected and saved from each animal. Dunnett's multiple range comparison test (two-tailed) was used to compare inlife body weights, cumulative body weight gain and food consumption for test and control groups. Terminal body weights, absolute organ weights, and organ/body weight ratios were evaluated by decision-tree statistical analysis procedures to detect group differences and analyze for trends.

Broiler Chicken Six-Week Study

Commercial broiler chicks (White Plymouth Rock x White Cornish; Cobb 500 cockerel x Cobb 500 pullet) were fed test diets containing processed meal from GTS 40-3-2 or the control parental non-transgenic A5403 soybeans, supplemented with corn meal as the only other source of protein. Diets were formulated so as to ensure approximately equal amounts of essential amino acids (methionine, cysteine, lysine, arginine, tryptophan, and threonine), did not contain any medications or growth promoting feed additives, and met the National Research Council requirements for poultry feed. Birds were checked daily for mortality, and any that died on test were removed, weighed and necropsied to determined probable cause of death. Body weights and food consumption were measured, and at the termination of the study, birds were sacrificed and major and minor pectoralis muscles (breast muscles) from the right side were dissected and weighed. Abdominal fat pads were also removed and weighed.

Dairy Cow Four-Week Study

Thirty-six multiparous Holstein dairy cows (93-196 days of lactation) were fed a mixed diet ration (35% alfalfa hay, 17% corn silage, 37% commercial grain mix) containing 10% (w/w dry matter basis) raw soybeans from GTS 40-3-2 or control non-transgenic A5403 soybean lines. This dietary level represented the upper limit for incorporation of raw soybeans into mixed cow diets as fed by dairy farmers, and cows were pre-adapted to high soybean diets prior to the start of the study. Milk samples collected daily during the course of the study were analyzed for lactose, fat, protein, and somatic cells. Total urine and fecal output was collected daily during the last week of the study to determine dry matter digestibility and nitrogen balance.

Catfish Ten-Week Study

Fingerling channel catfish (Ictalurus punctatus), Mississippi Select strain, were maintained for 10 weeks

in glass aquaria and reared on a diet containing soybean meal from GTS 40-3-2 or control non-transgenic soybeans at the same substitution levels used commercially (45-47% w/w). All diets were prepared to contain a final protein concentration of 32%. Fish were weighed at the beginning of the study and on weeks 2, 6, and 10, at which times feed consumption was quantified by subtracting the weight of uneaten pellets removed from the bottoms of tanks from the quantity of feed administered. The cumulative feed conversion ratio was estimated at weeks 2, 6, and 10 by dividing the sum of the feed offered to that point by corresponding total weight gain, adjusting for mortalities. At the end of the study, several fish were selected at random and the edible tissue composited and subjected to proximate analysis.

Table 5. Comparison of feed efficiencies across feeding studies

Line	*Mean Feed Consumption* (g/animal)	*Mean Feed Efficiency*	*Mean Weight Gain* (g)	*Mean Final Weight* (g)
Rat Feeding Study (4 weeks) Processed soybeans				
Males				
Negative control	811	4.58	177[a]	426[a]
A5403 control	764	4.63	165[a,b]	415[a,b]
GTS 40-3-2	749	4.86	154[b]	403[b]
Females				
Negative control	549	8.23	66.7	256
A5403	538	7.87	68.4	259
GTS 40-3-2	538	8.78	61.3	252
Rat Feeding Study (4 weeks) Unprocessed soybeans				
Males				
Negative control	753	6.55	115	431
A5403 5%	755	7.26	104	421
A5403 10%	769	7.25	106	424
GTS 40-3-2 5%	750	7.35	102	420
GTS 40-3-2 10%	768	6.86	112	430
Females				
Negative control	510	12.6	40.6	241
A5403 5%	493	16.3	30.2	231
A5403 10%	513	13.9	36.8	238
GTS 40-3-2 5%	502	13.9	36.2	237
GTS 40-3-2 10%	491	14.2	34.6	236
Broiler Chicken Study (6 weeks) Processed soybeans				
Combined Sex – No statistically significant differences were observed, p<0.05				
A5403 control	3893	1.816	2147	2193
GTS 40-3-2	3844	1.832	2099	2144
Catfish Study (10 weeks) Processed soybeans				
Mixed Sex - No statistically significant differences were observed, p<0.05				
A5403 control	22.1	1.12	19.7	22.6
GTS 40-3-2	21.8	1.17	18.8	21.8

[a], [b]: Means with different letters are statistically different, p<0.05

Line	*Milk* (kg/day)	*Fat* (%)	*3.5% Fat-corrected milk (FCM)* (kg/day)	*Net Energy Intake* (mcal NEL/day)	*FCM/NEL* (kg/mcal)
Dairy Cow Study (4 weeks) Raw, cracked soybeans					
A5403 control	34.9	3.37	34.1[a]	40.1	0.81
GTS 40-3-2	36.2	3.59	36.8[b]	42.9	0.88

[a], [b]: Means with different letters are statistically different, p<0.05

Results

The feed efficiencies (feed conversion ratios) of both GTS 40-3-2 and non-transgenic control soybeans, when used as components of animal feed, were summarized and compared across studies (Table 5). The bobwhite quail study was not included in this comparison because of its short duration (5 days). No statistically significant differences in feed efficiencies were observed when GTS 40-3-2 was used as a feed source compared to the parental variety, A5403. These results were consistent with the extensive compositional analyses demonstrating that GTS 40-3-2 was not significantly different from the control soybeans in terms of its nutritional properties.

References

Anderson, R.L., Rackis, J.J. & Tallent, W.H. (1979). Biologically active substances in soy products. In: Soy Protein and Human Nutrition. H.L. Wilke, D.T. Hopkins & D.H. Waggle, eds. Academic Press, New York. pp. 209-233.

AOAC Method 44-15A. (1987). Moisture-air-oven methods. In AOAC Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.

AOAC Method 7.066-7.070. (1984). Fiber (crude) in animal feed, ceramic fiber filter method. In AOAC Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.

AOAC Method 920.39C. (1990). Fat (crude) of ether extract in animal feed. In AOAC Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.

AOAC Method 923.03. (1990). In Official Methods of Analysis, 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, modified.

AOAC Method 983.23. (1990). Fat in foods, chloroform-methanol extraction. In Official Methods of Analysis, 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.

AOAC Method 988.05. (1990). Protein (crude) in animal feed, CuSO4/TiO2 mixed catalyst Kjeldahl method. In AOAC Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.

AOAC Method Ja 7b-91 (1993). In Official Methods and Recommended Practices of the Association of Official Analytical Chemists, 4th Edition, Arlington, Virginia.

Dunmire, D. & Otto, S. (1979). HPLC determination of sugars in various food products. *Journal of the Official Association of Analytical Chemists* **62**, 176-185.

Ellis, R. & Morris, E.R. (1983). Improved ion-exchange phytate method. *Cereal Chem.* **60**, 121-124.

Haslam, E. (1993). Shikimic acid: Metabolism and metabolites. John Wiley & Sons, Chichester, England.

Klurfeld, D.M. & Kritchevski, D. (1987). Isolation and quantitation of lectins from vegetable oils. *Lipids* **22**, 667-668.

Leiner, I.E. (1953). Soyin, a toxic protein from the soybean. I. Inhibition of rat growth. *J. Nutr.* **49**, 527-540.

Leiner, I.E. (1955). The photometric determination of the hemagglutinating activity of soyin and crude soybean extracts. *Arch. Biochem. Biophys.* **54**, 223-231.

Leiner, I.E. (1980). Anti-nutritional factors as determinants of soybean quality. In: World Soybean Research Conference II: Proceedings. F. Corbin, ed. Westview Press, Boulder, CO. pp. 703-712.

Mohamed, A.I., Mebrahtu, T. & Rangappa, M. (1991). Nutrient composition and anti-nutritional factors in selected vegetable soybean (Glycine max L.). *Plant Foods Hum. Nutr.* **41**, 89-100.

Moore, S. & Stein, W.H. (1954). Procedures for the chromatographic determination of amino acids on four per cent cross-linked sulfonated polystyrene resins. *Journal of Biological Chemistry* **211**, 893-906.

Murphy, P.A. (1982). Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technology* **36**, 60-64.

Pettersson, H. & Kiessling, K.H. (1984). Liquid chromatographic determination of the plant estrogens coumestrol and isoflavones in animal feed. *Journal of the Official Association of Analytical Chemists* **67**, 503-506.

Pusztai, A. (1989). Lectins. *In*: Toxicants of Plant Origin: Volume II, Proteins and Amino Acids. P.R. Cheeke, ed. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 29-71.

Rackis, J.J. (1976). Flatulence problems associated with soy products. *In*: World Soybean Research. L.D. Hill, ed. The Interstate Printers and Publishers, Inc., Danville, IL. pp. 892-903.

Rackis, J.J., Wolf, W.J. & Baker, E.C. (1986). Protease inhibitors in plant foods: Content and inactivation. In: Nutritional and Toxicological Significance of

Enzyme Inhibitors in Food. M. Friedman, ed. Plenum Press, New York. pp. 299-347.

Setchell, K.D.R., Gosselin, S.J., Welsh, M.B., Johnston, J.O., Balistreri, W.F., Kramer, L.W., Dresser, B.L. & Tarr, M.J. (1987). Dietary estrogens - a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. *Gastroenterology* **93**, 225-233.

Smart, C.C., Johanning, D., Muller, G. & Amrhein, N. (1985). Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimate acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 16338-16346.

USDA Agriculture Handbook No. 8. (1975). Composition of Foods. In Agricultural Handbook No. 8. United States Department of Agriculture, Washington, D.C. pp. 159-165.

Waggle, D.H. & Kolar, C.W. (1979). Types of soy protein products. In: Soy Protein and Human Nutrition. H.L. Wilke, D.T. Hopkins, and D.H. Waggle, eds. Academic Press, New York. pp. 19-51.

Wang, G., Kuan, S.S., Francis, O.J., Ware, G.M. & Carman, A.S. (1990). A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. *J. Agric. Food. Chem.* **38**, 185-190.

Weiss, U. & Edwards, J.M. (1980). Regulation of the shikimate pathway. *In*: The Biosynthesis of Aromatic Compounds. John Wiley & Sons, New York, pp. 287-301 ●

Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments génétiquement modifiés
outils *à l'intention* des formateurs

La FAO reconnaît que les biotechnologies constituent un outil important pour le développement durable de l'agriculture, des pêches et des forêts, ainsi que du secteur agro-alimentaire. À condition d'être judicieusement associées à d'autres technologies de production de denrées alimentaires ou de produits et de services agricoles, les biotechnologies peuvent contribuer dans une large mesure à la satisfaction des besoins d'une population en expansion et toujours plus urbanisée.

Ce programme de formation, *Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments génétiquement modifiés: Outil à l'intention des formateurs* est constitué de trois parties et accompagné d'un CD-ROM contenant les supports visuels et les autres matériels de référence pertinents. La première partie, *Principes de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné*, donne des orientations pour la mise en œuvre d'un cadre efficace pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné. La deuxième partie, *Outils et techniques à l'intention des formateurs* est un guide pratique pour la préparation et la tenue d'un atelier sur le même thème. Elle contient plusieurs listes récapitulatives et fiches, un modèle d'ordre du jour et un modèle de fiche d'évaluation d'un atelier, ainsi que cinq modules de présentation utiles pour les formateurs. Toutes les fiches, présentations et copies des documents pertinents du Codex alimentarius sont incluses dans le CD-ROM d'accompagnement. La troisième partie, consacrée aux *Études de cas*, présente trois dossiers d'évaluation de la sécurité sanitaire qui ont été condensés pour les besoins de la formation.
À l'achèvement de la formation dispensée à l'aide de ce guide, ceux qui l'auront suivie seront capables de planifier et de dispenser une formation à l'évaluation de la sécurité sanitaire des AGM que les autorités compétentes, les responsables de la règlementation et/ou les scientifiques spécialisés dans ce domaine pourront intégrer dans leurs propres programmes de formation.

ISBN 978-92-5-105978-4

9 789251 059784

TC/M/I0110E/1/04.08/2000