



USAID
FROM THE AMERICAN PEOPLE

ÉVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL ASSOCIÉ AUX PLANTES TRANSGÉNIQUES AVANT LEUR MISE EN MARCHÉ

ÉTUDE CASTÉMOINS BASÉE SUR LE COTON MON 15985

AUGUST 2007

This publication was produced for review by the United States Agency for International Development. It was prepared by DAI.

ÉVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL ASSOCIÉ AUX PLANTES TRANSGÉNIQUES AVANT LEUR MISE EN MARCHÉ

ÉTUDE CASTÉMOINS BASÉE SUR LE COTON MON 15985

Program Title:	Short-Term Assistance in Biotechnology
Sponsoring USAID Office:	EGAT/ESP/IRM
Contract Number:	EDH-I-00-05-00004-00/01
Contractor:	DAI
Date of Publication:	August 2007
Author:	AGBIOS

The authors' views expressed in this publication do not necessarily reflect the views of the United States Agency for International Development or the United States Government.

**ÉVALUATION DU RISQUE
ENVIRONNEMENTAL ASSOCIÉ AUX
PLANTES TRANSGÉNIQUES AVANT
LEUR MISE EN MARCHÉ: ÉTUDE CAS-
TÉMOINS BASÉE SUR LE
COTON MON 15985**



The development and translation of this case study has been supported by funding from the USAID RAISE-Plus award.

August 2007

TABLES DES MATIÈRES

TABLES DES MATIÈRES	3
TABLEAUX	5
FIGURES	6
Introduction	7
Évaluation du risque pour l'environnement	8
1. Principes de l'évaluation du risque	8
1.A Danger	9
1.B Exposition	10
1.C Caractérisation du risque	10
2. Gestion du risque et prise de décisions	11
3. Évaluation du risque pour l'environnement associé aux cultures transgéniques	12
Normes internationales pour l'évaluation du risque pour l'environnement associé aux plantes transgéniques	15
4. Organisation de coopération et de développement économiques	15
4.A Catégories de renseignements	17
4.A-1 Renseignements de base	18
4.A-2 Caractérisation du produit	18
4.A-3 Conséquences sur l'environnement	19
5. Protocole de Cartagena sur la prévention des risques biotechnologiques	21
6. Convention internationale pour la protection des végétaux	25
Étude de cas sur la lignée de coton MON 15985	28
7. Introduction à l'étude de cas	28
8. Renseignements de base	29
8.A L'organisme hôte	29
8.A-1 Description taxonomique	29
8.A-2 Centres d'origine et diversité génétique du coton	30
8.A-3 Ploïdie du coton, de ses ascendants et des espèces sexuellement compatibles	30
8.A-4 Sélection du coton, production de graines et pratiques agronomiques	30
8.A-5 Consommation et utilisations du coton	31
8.A-6 Biologie de la reproduction	32
8.A-7 Répartition des espèces apparentées, incluant tout signe d'envahissement	35
8.A-8 Ravageurs et maladies courants du coton	36
8.A-9 Interactions possibles avec les autres organismes	38

8.B	Organisme(s) donneur(s).....	38
8.B-1	Identification des organismes donneurs.....	38
8.B-2	Innocuité des organismes donneurs.....	38
8.C	Le milieu récepteur.....	40
8.C-1	Présence d'espèces sexuellement compatibles, incluant des populations férales....	40
8.C-2	Pratiques agronomiques.....	40
9.	Caractérisation du produit.....	41
9.A	Caractérisation génétique moléculaire.....	41
9.A-1	Méthodes courantes de transformation végétale.....	43
9.A-2	Méthode de transformation de la lignée MON 531.....	46
9.A-3	Méthode de transformation de la lignée MON 15985.....	48
9.A-4	Caractérisation de l'ADN introduit.....	51
9.A-5	Stabilité et hérédité génétiques.....	60
9.B	Matériel Exprimé.....	62
9.B-1	Niveaux d'expression des protéines dans différents tissus végétaux.....	63
9.B-2	Études sur les équivalents protéiques.....	69
9.C	Caractérisation phénotypique.....	74
9.C-1	Caractéristiques agronomiques et morphologiques.....	74
9.C-2	Efficacité.....	77
10.	Conséquences de l'introduction dans l'environnement.....	78
10.A	Conséquences du transfert potentiel de gènes à des végétaux apparentés.....	79
10.B	Potentiel d'établissement et de persistance.....	81
10.C	Effets indésirables secondaires ou non visés potentiels.....	84
10.C-1	Organismes d'essai non visés.....	84
10.C-2	Effets sur les organismes non visés.....	86
10.C-3	Considérations liées aux espèces en voie de disparition aux États Unis.....	93
10.C-4	Effets combinés des protéines Cry1Ac et Cry2Ab2.....	93
10.D	Devenir dans l'environnement et exposition aux protéines exprimées.....	95
11.	Autres Considérations.....	96
11.A	Incertitude résiduelle.....	97
11.B	gestion de la résistance des insectes et bonne gestion des produits.....	99
11.C	Incidences sur l'agriculture, y compris les avantages de l'adoption.....	99
11.D	Surveillance et suivi.....	103
	Conclusions.....	105
	Références.....	107

-

TABLEAUX

Tableau 1 Comparaison des renseignements exigés par le Protocole de Cartagena et la directive de l'OCDE, aux fins de l'évaluation des risques.....	23
Tableau 2 Résumé des autorisations réglementaires à l'égard de la lignée de coton MON 15985 (juin 2007)	29
Tableau 3 Stades de croissance du coton (BIO, 2006)	31
Tableau 4 Fréquences de pollinisation croisée de MON 15985 au Burkina Faso	33
Tableau 5 Répartition connue des espèces de <i>Gossypium</i> en Afrique (Vollesen, 1987; Percival <i>et al.</i> , 1999).....	36
Tableau 6 δ -endotoxines de Bt et leur spectre d'activité contre des insectes nuisibles particuliers	39
Tableau 7 Résumé des éléments génétiques contenus dans le plasmide PV-GHBK04	47
Tableau 8 Résumé des éléments génétiques sur le fragment de 6 kb de l'ADN transformant de PV-GHBK11	50
Tableau 9 Résumé de la caractérisation moléculaire de MON 15985.....	60
Tableau 10 Données de ségrégation et analyse de la descendance de la lignée de coton MON 15985.....	62
Tableau 11 Résumé des concentrations en protéines Cry2Ab2 et GUS dans divers tissus prélevés à différents endroits aux États-Unis, durant la saison au champ 1998.....	65
Tableau 12 Concentrations en protéine Cry2Ab2 dans les échantillons de jeunes feuilles de la lignée MON 15985 prélevés à différents endroits aux États-Unis, durant la saison au champ 1998.....	65
Tableau 13 Concentrations en protéine Cry2Ab2 dans les échantillons de feuilles saisonnières de la lignée MON 15985 prélevés à différents endroits aux États-Unis, en 1998.....	65
Tableau 14 Concentrations en protéine Cry2Ab2 dans les échantillons de graines de la lignée MON 15985, prélevés à différents endroits aux États-Unis, durant la saison au champ 1998.....	66
Tableau 15 Concentrations en protéine Cry2Ab2 dans les échantillons de plante entière de la lignée MON 15985, prélevés à différents endroits aux États-Unis durant la saison au champ 1998.....	66
Tableau 16 Concentrations en protéine GUS dans les échantillons de feuilles de la lignée MON 15985 prélevés à différents endroits aux États-Unis, durant la saison au champ 1998	67
Tableau 17 Concentrations en protéine GUS dans les échantillons de coton graine de la lignée MON 15985, prélevés à différents endroits aux États-Unis durant la saison au champ 1998.....	67
Tableau 18 Résumé des caractéristiques de la protéine Cry2Ab.....	70
Tableau 19 Résumé de la moyenne du rapport hauteur/nœuds, du nombre de jours avant la floraison maximale et du nombre total de capsules ouvertes à huit endroits des États-Unis, en 1998	75
Tableau 20 Fréquences d'introgession pour la lignée MON 15985 au Burkina Faso.....	81
Tableau 21 Résultats de germination et de dormance des graines de la lignée de coton MON 15985, récoltées à trois endroits en 1999	83
Tableau 22 Résultats des tests de germination et de vigueur des plants avec des graines récoltées à deux endroits en 1998.....	83

Tableau 23 Résumé des études sur les effets de la protéine Cry2Ab2 sur des organismes non visés	88
Tableau 24 Étude sur les effets de la lignée MON 15985 sur les insectes non visés à Farako-Bâ (2004-2005) Nombres d'insectes piégés dans les champs.....	94
Tableau 25 Ensemble des avantages associés à la culture du coton transgénique résistant aux insectes, selon différents taux d'adoption (Sanders <i>et al.</i> , 2005).....	101
Tableau 26 Effet de l'imposition de droits liés à l'usage de la technologie du coton transgénique résistant aux insectes sur le mélange de cultures et les profits agricoles (Sanders <i>et al.</i> , 2005)	101
Tableau 27 Résumé des avantages financiers (\$ US/hectare) pour les petits et grands agriculteurs d'Afrique du Sud, après l'adoption du coton transgénique résistant aux insectes, en 2004 (adapté de Gouse <i>et al.</i> , 2005).....	103

FIGURES

Figure 1 Carte du plasmide PV-GHBK04.	46
Figure 2 Carte du plasmide PV-GHBK11.	48
Figure 3 Séquence protéique déduite de Cry2Ab2 dans la lignée de coton MON 15985.	50
Figure 4 Séquence d'acides aminés déduite de la protéine GUS exprimée dans MON 15985.	51
Figure 5 Analyse par transfert de Southern de la lignée MON 15985 : Détermination des sites d'insertion.....	52
Figure 6 Analyse par transfert de Southern de la lignée MON 15985 : Analyse du nombre de copies.	53
Figure 7 Analyse par transfert de Southern de la lignée MON 15985 : Intégrité de la région codante de cry2Ab.....	54
Figure 8 Analyse par transfert de Southern de la lignée MON 15985 : Intégrité de la région codante de uidA.....	56
Figure 9 Analyse par transfert de Southern de la lignée MON 15985 : Intégrité de la cassette d'expression de uidA – sonde uidA.	57
Figure 10 Analyse par transfert de Southern de la lignée MON 15985 : Analyse des séquences squelettiques.	58
Figure 11 Confirmation par PCR des séquences des extrémités 5' et 3' de l'insert dans la lignée MON 15985.	59
Figure 12 Carte de restriction de l'insert dans la lignée MON 15985.....	60
Figure 13 Carte de la descendance de plusieurs générations de la lignée de coton MON 15985 utilisées pour des analyses précises.	61
Figure 14 Production moyenne de fibres (en livres par acre) pour l'ensemble des endroits où des essais au champ ont été menés en 1998 et 1999.	76
Figure 15 Caractéristiques du rendement en pourcentage du rendement de la lignée DP50 durant les essais au champ en 1998 et 1999.	76
Figure 16 Pourcentage de mortalité du ver de la capsule du coton, 72 heures après l'infestation de tissus foliaires obtenus au champ.	78

INTRODUCTION

Depuis plus de 20 ans, l'application des outils de la biotechnologie moderne nous permet de produire des végétaux présentant des caractères qu'il serait sans doute impossible d'obtenir par les techniques de sélection classiques. En théorie, les techniques de l'ADN recombinant (ADNr) offrent la possibilité de transférer des gènes spécifiques de tout organisme naturel vers d'autres végétaux qui présentent une importance sur le plan économique. Durant ce processus, quelques végétaux modifiés sont sélectionnés parmi des centaines, voire des milliers d'"événements", sur la base des propriétés recherchées pour un usage particulier. Par la suite, les processus d'élimination des plantes indésirables et de sélection de la plante finale en vue d'un usage particulier sont les mêmes, quelle que soit la technique ayant servi à l'obtention de cette plante. Les scientifiques qui ont étudié l'innocuité de la technique de l'ADNr (biotechnologie moderne) sont donc arrivés à la conclusion que les risques potentiels pour l'environnement (p. ex., effets nocifs sur des espèces et des habitats protégés) sont les mêmes que ceux associés aux végétaux obtenus par sélection classique (NAS, 1987; NRC, 1989). En d'autres mots, rien ne permet d'affirmer que la méthode utilisée pour produire une nouvelle variété végétale (qu'il s'agisse de la sélection classique, du génie génétique ou d'une combinaison des deux¹) constitue un paramètre efficace pour prévoir l'incidence qu'aura ce végétal sur l'environnement. Selon le vaste consensus qui existe aujourd'hui, l'évaluation scientifique de la sécurité environnementale doit tenir compte de la nature du végétal, du caractère introduit, du milieu récepteur probable ainsi que des interactions entre eux.

Cependant, comme c'est le cas avec bon nombre de technologies nouvelles, tous ne sont pas d'avis que les avantages et les risques potentiels associés à l'utilisation de la biotechnologie moderne (également désignée génie génétique ou modification génétique), pour la production de cultures et d'aliments nouveaux, sont équivalents à ceux découlant de l'usage de la sélection classique. En effet, les opinions divergent quant aux effets possibles de la biotechnologie sur les humains, les animaux et l'environnement, et bon nombre de ces opinions s'appuient sur des aspects qui débordent du cadre scientifique. Et l'une des plus grandes difficultés pour cette technologie ainsi que pour les décideurs publics est d'intégrer un processus d'évaluation scientifique à un processus décisionnel qui soit socialement acceptable.

Dans chaque pays où des cultures issues de la biotechnologie (que l'on désigne dans certaines régions du monde d'organismes vivants modifiés ou OVM) sont commercialisées, ces préoccupations et les risques d'effets nocifs sur l'environnement et la santé humaine sont pris en compte par l'élaboration de régimes réglementaires visant expressément à évaluer l'innocuité de ces produits et à en contrôler l'utilisation. L'acceptation des nouvelles technologies par le public, y compris des produits issus de la biotechnologie comme les aliments et les fibres génétiquement modifiés (GM) dérivés de cultures génétiquement modifiées, est souvent liée à la confiance que porte le public au système de réglementation et aux institutions gouvernementales. Or cette confiance

¹ La plupart des cultures génétiquement modifiées actuellement disponibles sont issues d'un processus au cours duquel une seule plante génétiquement modifiée est par la suite soumise à des processus de sélection classique, pour la production de la culture commerciale.

s'appuie, dans une large mesure, sur la perception qu'a le public l'évaluation et la gestion des risques pour la santé humaine et l'environnement sont basées sur des données scientifiques rigoureuses.

Le présent document propose une introduction aux concepts et aux principes de l'évaluation des risques environnementaux associés aux plantes transgéniques et inclut une discussion sur l'harmonisation internationale de l'évaluation des cultures issues de la biotechnologie moderne. Une telle harmonisation du processus d'évaluation permet de s'assurer que la rigueur scientifique qui s'impose est suivie en tout temps, que l'évaluation des risques se fait conformément aux principes établis et que les processus réglementaires sont compris par les parties qui demandent et qui rendent les décisions réglementaires. L'harmonisation des principes et des processus qui sous-tendent l'évaluation du risque environnemental est un objectif important pour les parties préoccupées par l'introduction et le commerce international efficaces et sans danger de cultures génétiquement modifiées. Un grand nombre de modèles utiles et appropriés ont été mis au point pour assurer une évaluation des risques environnementaux, qui soit fondée sur des méthodes scientifiques éprouvées (NRC, 1983; Tiedje *et al.*, 1989; OCDE, 1993) et soit conforme aux traités internationaux (p. ex., la Convention sur la diversité biologique et la Convention internationale pour la protection des végétaux). Cependant, en plus d'instaurer un processus d'évaluation scientifique approprié, les pays doivent aussi tenir compte des intérêts sociaux, y compris des paramètres économiques, dans la prise de décisions et la gestion des risques.

Enfin, ce document présente une étude de cas sur le coton lignée MON 15985 résistant aux insectes (Bollgard II[®]), pour illustrer les types d'éléments d'information habituellement pris en considération dans l'évaluation des risques potentiels pour l'environnement.

Ce document traite uniquement de l'évaluation des risques environnementaux associés aux cultures transgéniques, mises au point pour la production de denrées destinées à l'alimentation humaine et animale ou de fibres. Il n'aborde pas expressément les questions liées à l'évaluation de la salubrité des aliments ou à l'utilisation des plantes transgéniques pour la fabrication de produits chimiques pharmaceutiques ou industriels, car ces activités relèvent habituellement d'un régime réglementaire différent. La discussion qui suit propose un examen des questions scientifiques et des préoccupations soulevées par les cultures transgéniques destinées à être disséminées en milieu ouvert dans l'environnement.

ÉVALUATION DU RISQUE POUR L'ENVIRONNEMENT

1. PRINCIPES DE L'ÉVALUATION DU RISQUE

L'évaluation scientifique du risque est une des pierres angulaires des systèmes de réglementation de la biotechnologie, ainsi que de la prise de décisions stratégiques concernant la salubrité et l'acceptabilité des cultures génétiquement modifiées. Certains pays y greffent également d'autres volets, comme l'examen de questions sociales,

économiques ou éthiques. Cependant, quelle que soit la nature précise du système d'évaluation, il est généralement admis que l'évaluation du risque doit nécessairement s'appuyer sur de solides capacités scientifiques et une vaste base de connaissances et comporte les phases suivantes : identification des dangers, évaluation de leur ampleur et de leur durée et estimation de leur probabilité de survenue, en tenant compte de la nature et de l'importance des incertitudes inhérentes à chaque phase.

De nombreux modèles d'évaluation du risque s'appuient sur un processus scientifique pour évaluer quantitativement la probabilité du risque, de manière à éliminer le plus possible les biais personnels et les facteurs émotifs qui influencent la perception du risque (NRC, 1983). Le risque est le plus souvent perçu comme un élément négatif ou nocif; il ne faut toutefois oublier que l'évaluation du risque pourrait aussi mettre en lumière des effets bénéfiques ou neutres. Le risque est habituellement défini comme la probabilité que des effets nocifs se manifestent sur les humains ou l'environnement, à la suite de la consommation ou de quelque autre exposition due à la dissémination d'un agent dans l'environnement (p. ex., un produit chimique ou un végétal génétiquement modifié). Dans cette définition, l'environnement s'entend au sens large et inclut les animaux domestiques et sauvages, les plantes et les microorganismes. L'évaluation du risque est donc un processus qui consiste à déterminer la *"relation entre l'exposition prévue et les effets défavorables et elle comporte quatre étapes principales, à savoir l'identification du danger, l'évaluation de la relation dose-effet², l'évaluation de l'exposition et la caractérisation du risque"* [traduction] (OCDE, 1995). L'objectif de l'évaluation du risque est d'obtenir des données sur les risques qui soient transparentes et fondées sur la science, pour étayer le processus de prise de décisions.

Risque = f (danger x exposition)

Une formule souvent utilisée consiste à exprimer le risque en fonction d'un danger ou d'un effet défavorable (c.-à-d. l'ampleur et la durée du danger) et de la probabilité que l'effet nocif se manifeste (exposition).

1.A DANGER

Dans le contexte de l'évaluation du risque, le "danger" doit être perçu comme un processus servant à déterminer et à caractériser la nature, l'ampleur et la durée d'un effet nocif potentiel. Durant l'évaluation du risque, mais avant sa caractérisation, on a souvent recours à un processus désigné "évaluation du danger". Il s'agit d'un processus en deux étapes que le Programme international sur la sécurité des substances chimiques (IPCS, 2004) définit comme suit : "processus visant à déterminer les effets nocifs possibles d'un agent ou d'une situation lorsqu'un organisme, un système ou une (sous)-population y est exposé(e)" [traduction]. Ce processus comporte des étapes précises qui ont pour but d'identifier le danger et de le caractériser. Comme son titre l'indique, l'évaluateur du risque doit d'abord définir le type et la nature des effets nocifs qu'un agent (p. ex., une culture génétiquement modifiée) pourrait causer dans un organisme, un système ou une (sous)-population visé. Chaque danger potentiel ainsi identifié doit ensuite être caractérisé, quant à ses conséquences quantitatives (p. ex., relation dose-effet) ou

² À noter que l'IPCS (2004) définit lui aussi l'évaluation du risque comme un processus en quatre étapes. Il utilise toutefois l'expression "caractérisation du danger" plutôt que relation dose-effet, en accord avec la définition de l'OCDE (1995).

qualitatives. L'évaluation du danger est donc un processus qui consiste à évaluer de façon générale les dangers possibles, leurs liens et voies de causalité, puis à sélectionner les effets nocifs les plus pertinents sur la base de critères scientifiques (y compris la vraisemblance) et du jugement d'experts et, enfin, à décrire la ou les conséquences préjudiciables qui pourraient survenir, sur la base des données quantitatives et qualitatives recueillies. Les conséquences potentielles sont examinées en fonction de leur gravité, de leur étendue spatiale et temporelle et de la probabilité qu'elles augmentent ou diminuent dans le temps. Une des principales difficultés liées à l'évaluation du danger environnemental est de définir clairement ce qu'est un "effet nocif", aux fins de l'évaluation scientifique.

1.B EXPOSITION

Selon le Programme international sur la sécurité des substances chimiques (IPCS, 2004), l'exposition se définit comme la "concentration ou la quantité d'un agent particulier qui atteint un organisme, un système ou une (sous)-population cible, à une fréquence particulière et pendant une durée définie" [traduction]. D'après la formule qui précède, l'exposition correspond au volet "probabilité" du risque. Les évaluateurs du risque examinent les propriétés et les usages proposés de l'agent causant l'exposition. L'évaluation de l'exposition détermine les organismes et les populations susceptibles d'être exposés, ainsi que les mécanismes qui donneront lieu à une exposition. Un autre objectif de l'évaluation de l'exposition est de comprendre le devenir d'un agent, y compris sa migration potentielle dans l'ensemble ou hors de la zone d'intérêt (p. ex., flux génétique sous l'effet de la dérive ou de la dissémination du pollen).

1.C CARACTÉRISATION DU RISQUE

La dernière étape de l'évaluation du risque consiste à intégrer les données sur les dangers et l'exposition pour caractériser ou estimer le risque associé à l'activité proposée. Certains représentent la caractérisation du risque comme une matrice à l'intérieur de laquelle la caractérisation distincte du danger (p. ex., négligeable, faible, modéré et élevé) et de l'exposition (p. ex., hautement improbable, improbable, probable et très probable) est présentée sous forme matricielle (voir OGTR, 2005). L'Environmental Protection Agency des États-Unis (US EPA, 1998) divise cette dernière étape en deux volets, à savoir l'estimation du risque – qui consiste en une analyse scientifique des données – et la caractérisation du risque qui a pour but de décrire le risque en fonction de "l'importance des effets nocifs du risque et de la qualité des sources de données qui en appuient la vraisemblance" [traduction] (US EPA, 1998). Un volet important de la caractérisation du risque consiste à décrire les incertitudes et les hypothèses inhérentes. La situation de risque est jugée minime lorsque le danger est considéré négligeable ou que la probabilité d'exposition est très faible (très improbable), ou les deux. Le risque peut également être considéré minime, si l'effet est de faible amplitude (p. ex., faible toxicité) et qu'aucun danger important n'est relevé, ou encore s'il est impossible d'établir un lien de causalité raisonnable entre un danger identifié et un effet nocif (faible exposition ou faible probabilité de survenue) sur la base des données disponibles.

2. GESTION DU RISQUE ET PRISE DE DÉCISIONS

La gestion du risque est un important concept qui mérite d'être examiné, notamment en préparation d'une discussion sur les cultures génétiquement modifiées. La gestion du risque est un processus décisionnel qui repose sur l'évaluation du risque, mais qui peut aussi être guidé par d'autres aspects (selon ce que prévoit la réglementation). Selon l'IPCS (2004), la gestion du risque est un *"processus décisionnel tenant compte des facteurs politiques, sociaux, économiques et techniques, s'appuyant sur des informations pertinentes d'évaluation des risques face à un danger et visant à élaborer, analyser et comparer des solutions réglementaires et non réglementaires et à sélectionner et mettre en œuvre une réponse réglementaire appropriée face à ce danger"*. Comme on l'a indiqué précédemment, les "principes scientifiques éprouvés" ne peuvent pas toujours, à eux seuls, nous indiquer les bons choix à faire ou les mesures à prendre pour protéger l'environnement. À titre d'exemple, dans sa réévaluation des risques associés à la dioxine, l'EPA n'a ciblé qu'un seul facteur – soit le cancer causé par les dioxines – sans tenir compte des autres préoccupations des intervenants, notamment les effets sur la santé autres que le cancer; le caractère équitable d'exposer une collectivité à un autre site de produits chimiques toxiques, alors qu'elle est peut-être déjà exposée à un nombre élevé de sites de ce genre; la possibilité que les caractéristiques de la population rendent cette dernière particulièrement sensible aux dommages causés par une charge corporelle additionnelle de dioxines; ainsi que les effets des mesures envisagées sur la valeur des propriétés foncières locales. *"Une caractérisation du risque fondée uniquement sur des questions scientifiques concernant la relation dose-effet des dioxines en regard du cancer pourrait être hautement insatisfaisante pour certaines personnes, car elle n'aborde qu'un aspect de leurs préoccupations les plus graves"* [traduction] (NRC, 1996).

La gestion du risque permet également à un organisme de réglementation de répondre à la question, "Que peut-on faire au sujet des risques identifiés?" Il peut y avoir des cas où peu de données laissent croire à une augmentation du risque, mais où l'incertitude qui persiste empêche l'organisme de réglementation de qualifier le risque de négligeable ou acceptable. Le cas échéant, l'organisme de réglementation peut assujettir l'approbation ou l'homologation à certaines conditions, par exemple en imposant un suivi pour permettre l'utilisation de l'agent dans des conditions précises. Certains systèmes réglementaires peuvent aussi limiter la durée des autorisations et exiger une réévaluation des risques sur la base de l'expérience et des nouvelles données acquises durant l'usage commercial, de manière à inclure une marge de sécurité dans le processus décisionnel. De nombreux systèmes réglementaires prévoient en outre des dispositions exigeant la présentation de toutes nouvelles données pertinentes à l'évaluation du risque, qui seraient mises en lumière durant l'usage commercial du produit.

La gestion du risque comporte donc des dimensions politiques, qui doivent tenir compte des valeurs de la société quant aux niveaux acceptables de risque et d'incertitude scientifique, afin d'agir dans l'intérêt public. Très souvent, la gestion du risque exige que les droits individuels (des promoteurs, de l'industrie ou des organismes) soient mis en équilibre avec la nécessité de protéger la santé humaine et l'environnement, y compris la santé animale et végétale, contre les effets nocifs de risques inacceptables. Idéalement, les paramètres politiques, sociaux, économiques, juridiques et éthiques, en regard desquels sont prises les décisions touchant la gestion du risque, doivent être bien définis et transparents.

En général, les avantages ne sont pas incorporés au processus de prise de décisions réglementaires concernant les agents chimiques. Or le processus décisionnel devrait tenir compte des avantages potentiels découlant de l'adoption d'un nouveau produit ou d'une nouvelle technologie. Prenons le cas des pesticides : d'une part, le développement de ces produits suscite des inquiétudes quant à la présence de résidus dans les aliments et à la pollution de l'environnement; d'autre part, le contrôle efficace des ravageurs qu'assure l'utilisation du pesticide permet d'accroître la production d'aliments par unité et peut en retour réduire le coût des aliments ainsi que les pressions exercées sur l'environnement pour accroître les superficies consacrées à la production d'aliments. Manifestement, la société accorde une valeur à ces deux volets, car elle souhaite à la fois prévenir les effets indésirables associés à ces produits et aussi profiter des avantages susceptibles d'en découler. Comme nous le verrons ci-après, le processus décisionnel s'appliquant aux cultures génétiquement modifiées a été élargi pour inclure d'autres facteurs, y compris les avantages.

3. ÉVALUATION DU RISQUE POUR L'ENVIRONNEMENT ASSOCIÉ AUX CULTURES TRANSGÉNIQUES

Dans un système réglementaire bien construit, les principes généraux précités de l'évaluation du risque environnemental doivent être intégrés. Comme les cultures transgéniques soulèvent des questions et des considérations uniques qui diffèrent d'un grand nombre des questions qui se posent pour les produits chimiques comme les pesticides de synthèse utilisés en agriculture, de nombreux aspects de l'évaluation du risque des produits chimiques ne sont pas pertinents. Pour certaines cultures transgéniques, comme les plantes protégées contre les insectes et les virus, l'évaluation du risque associé aux agents de lutte biologique utilisés pour protéger les cultures contre les ravageurs offre un bon cadre de référence. Cependant, en raison de la diversité des cultures transgéniques qui sont mises au point, il n'existe pas de modèle unique et, pour être efficace, l'évaluation du risque environnemental doit s'appuyer sur des principes de base.

L'évaluation du risque pour l'environnement que présentent les plantes transgéniques a pour but de déterminer et d'évaluer les risques associés à la dissémination et à la culture de ces plantes, en les comparant à ceux d'un végétal de référence classique dont l'usage s'est révélé sans danger. Dans les pays ayant établi des programmes réglementaires pour l'évaluation du risque environnemental des plantes transgéniques, il est certaines préoccupations communes en matière de sécurité qui doivent être examinées au cas par cas, avant la commercialisation d'une plante nouvelle (OCDE, 1993). En plus de recueillir des données sur la caractérisation moléculaire et la stabilité de la modification génétique (aspects qui ne sont pas directement examinés ici), il faut recueillir des éléments d'information sur l'organisme hôte, l'organisme donneur, l'impact du transfert de gènes à des plantes apparentées; le transfert de gènes à des organismes non apparentés et ses conséquences; le risque que le végétal se comporte comme une mauvaise herbe, ainsi que les effets indésirables secondaires et non visés.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, l'évaluation des risques potentiels pour l'environnement associés aux cultures transgéniques doit tenir compte de la nature du caractère introduit, de la culture et du milieu récepteur probable, ainsi que des

interactions entre eux. L'évaluation de la sécurité d'une culture transgénique pour l'environnement exige des connaissances comparatives sur la biologie de la culture non modifiée ainsi que sur les pratiques agricoles utilisées pour sa culture. Ces connaissances définissent la familiarité qui augmente avec l'expérience, c.-à-d. l'expérimentation et l'utilisation. Le concept de la familiarité est une démarche clé, qui est utilisée pour déterminer et évaluer les risques environnementaux et documenter les pratiques qui pourraient s'avérer nécessaires pour gérer les risques établis (OCDE, 1993; Hokanson *et al.*, 1999; EFSA, 2006). À titre d'exemple, les connaissances sur la biologie d'une plante peuvent aider à déterminer les dangers, en précisant les caractéristiques propres à la plante qui pourraient être altérées par le caractère introduit et amener ainsi la plante transgénique à se comporter comme une "mauvaise herbe" et envahir un habitat naturel ou être autrement dommageable pour l'environnement. De même, les données scientifiques sur la pollinisation et la biologie de la dispersion de la plante permettent d'étayer l'évaluation du risque, en fournissant des renseignements sur des éléments critiques qui ont une incidence sur l'exposition dans l'environnement. Enfin, la connaissance des pratiques de production établies offre un cadre de référence pour déterminer comment l'introduction d'un caractère nouveau peut modifier les pratiques agricoles et avoir ainsi une incidence sur l'environnement.

L'identification des dangers basée sur des données scientifiques tient compte à la fois des effets directs et indirects. Parmi les effets nocifs directs qu'il faut considérer, mentionnons la possibilité qu'un caractère introduit altère, par pollinisation croisée, le flux génétique vers des espèces végétales apparentées, que les populations d'insectes développent une résistance aux caractères insecticides génétiquement modifiés, que des effets nocifs imprévus se manifestent sur des organismes non ciblés (p. ex., toxicité) ou que des effets s'exercent sur la biodiversité si la plante devient une mauvaise herbe envahissante. Les effets indirects souvent associés aux cultures transgéniques incluent les effets sur la structure d'une communauté d'insectes dus à des mécanismes trophiques et la modification des pratiques culturales par l'introduction de la nouvelle variété. Souvent, les effets indirects posent plus de difficultés pour les organismes de réglementation, car leur probabilité de survenue peut être faible et leurs conséquences sont incertaines (p. ex., transmission horizontale de gènes) ou les données qui les appuient sont purement hypothétiques (p. ex., élargissement du spectre d'hôtes d'un phytovirus sous l'effet de la recombinaison génétique). De plus, comme nos connaissances sur l'importance de la structure et de la fonction écologique des communautés en agriculture sont très limitées, les effets détectés pourraient ne pas être nécessairement néfastes.

Selon l'usage, le processus d'évaluation du risque pour l'environnement associé aux cultures transgéniques doit d'abord porter sur l'agroécosystème, qui constituera vraisemblablement le milieu récepteur. Cependant, d'autres milieux pourraient aussi devoir être pris en considération, selon les propriétés de la culture transgénique, les circonstances de sa dissémination, sa propension au flux génétique, ainsi que le mouvement des gènes introduits par les semences, le pollen ou autre matériel végétal viable. Mais, plus important encore, l'évaluation du risque pour l'environnement vise à déceler les risques additionnels résultant du remplacement d'une variété végétale classique par une autre qui a été génétiquement modifiée. La détermination des effets sur la biodiversité ayant une incidence dans le contexte de la production de cultures constitue

un élément de base important pour identifier les dangers et déterminer les effets directs et indirects qui pourraient être nocifs.

La qualité de l'évaluation du risque environnemental avant la mise en marché est toutefois tributaire de la qualité des données dont dispose l'évaluateur du risque. Les sciences écologiques et agricoles servent de fondement permettant de déterminer si les perturbations (positives ou négatives) découlant de l'introduction potentielle d'une culture transgénique peuvent être mesurées et évaluées. Or les connaissances actuelles sur les écosystèmes et sur la biologie des organismes hôtes non modifiés (y compris leurs interactions potentielles à l'intérieur des écosystèmes), qui peuvent servir à l'évaluation du risque, varient quant à leur qualité et à leur pertinence pour l'analyse du risque environnemental. En Australie, l'Office of Gene Regulator (OGTR) a reconnu ces limites dans son cadre d'analyse du risque (OGTR, 2005), notant que certaines données ont plus de poids que d'autres pour l'évaluation du risque. Il précise notamment que les données provenant d'études validées et menées conformément à des protocoles reconnus internationalement ont plus de poids que les rapports ou publications indépendants uniques révisés par des pairs, eux-mêmes plus dignes de foi que des allégations non corroborées (voir OGTR, 2005). L'OGTR souligne également l'importance d'inclure un contrôle de vraisemblance dans l'identification des dangers : "*Bien qu'il soit important de déterminer tous les dangers potentiels, il importe également d'appliquer un test de vraisemblance*" (OGTR, 2005). Même si toutes les données sont prises en considération dans une évaluation des risques environnementaux associés à une culture génétiquement modifiée, il importe également de tenir compte de la qualité de ces données, et la manière dont cette information a été évaluée doit être expliquée par l'évaluateur du risque dans son document de décision.

La discussion qui suit présente trois exemples de normes internationales sur l'évaluation du risque environnemental, basées sur le document de consensus de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), le Protocole de Cartagena sur la prévention des risques biotechnologiques relatif à la Convention sur la diversité biologique (le Protocole) et la Convention internationale pour la protection des végétaux de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). Ces normes englobent toutes le concept du risque relatif, lequel signifie que les dangers potentiels associés à l'introduction d'un nouvel organisme (ou d'une nouvelle pratique) doivent être évalués en regard d'un produit ou d'une pratique déjà existant ainsi que du milieu récepteur (p. ex., écosystèmes agricoles ou écosystèmes naturels). Ces normes réitèrent également le fait qu'une évaluation des risques adéquate doit être basée sur des données scientifiques éprouvées et tenir compte de toute l'information disponible et de l'opinion d'experts, s'il y a lieu. Enfin, bien que ces normes soient similaires quant à leur démarche pour l'évaluation des préoccupations scientifiques, elles diffèrent par leur traitement des autres considérations.

NORMES INTERNATIONALES POUR L'ÉVALUATION DU RISQUE POUR L'ENVIRONNEMENT ASSOCIÉ AUX PLANTES TRANSGÉNIQUES

4. ORGANISATION DE COOPÉRATION ET DE DÉVELOPPEMENT ÉCONOMIQUES

En 1993, l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) a publié les principes généraux adoptés par ses États membres, lesquels devraient s'appliquer à la production et à la commercialisation à grande échelle des plantes transgéniques.

Selon l'OCDE :

"Dans le domaine des biotechnologies, la sécurité résulte de l'application appropriée de l'analyse risque/sécurité et de la gestion du risque. L'analyse risque/sécurité comprend l'identification des risques et, si un risque est identifié, son évaluation. L'analyse risque/sécurité repose sur les caractéristiques de l'organisme, le caractère introduit, l'environnement dans lequel l'organisme est introduit, l'interaction entre eux et l'application visée. Elle est réalisée avant une action projetée et constitue généralement un élément usuel de la recherche, de la mise au point et des essais des nouveaux organismes, que ce soit en laboratoire ou en plein champ. L'analyse risque/sécurité est une procédure scientifique qui n'implique pas et n'exclut pas le contrôle réglementaire et ne signifie pas que chaque cas devra être nécessairement examiné par une autorité nationale ou autre." (OCDE, 1993)

L'évaluation de la sécurité selon le modèle de l'OCDE repose sur deux concepts importants, nommément la familiarité et l'évaluation comparative.

Afin de pouvoir évaluer la sécurité d'une plante transgénique pour l'environnement, il faut connaître non seulement la biologie de la plante, mais aussi les pratiques agricoles employées pour la cultiver. Ce concept de "familiarité", qui a été élaboré conjointement par différents groupes (NRC, 1989; Tiedje *et al.*, 1989), est un aspect déterminant pour identifier et évaluer les risques pour l'environnement et étayer les pratiques pouvant s'avérer nécessaires pour gérer les risques identifiés. Trois hypothèses importantes sous-tendent ce concept :

- (1) Le génie génétique ne présente pas en soi plus de risque que la sélection classique et les transgènes introduits se comportent essentiellement de la même manière que tout autre gène du génome d'une plante;
- (2) nous avons acquis beaucoup d'expérience dans l'introduction de caractères nouveaux dans les cultures et l'évaluation de ces nouvelles variétés agricoles; et
- (3) la familiarité augmente avec le temps et l'expérience.

Cependant, afin de pouvoir parvenir à la conclusion de "familiarité", il faut posséder des connaissances suffisantes sur la biologie du végétal, le caractère introduit et le milieu récepteur. Ainsi, des connaissances sur la biologie d'un végétal peuvent aider à déterminer les caractéristiques propres à l'espèce qui pourraient être modifiées par le caractère introduit et amener ainsi la culture transgénique à se comporter comme une mauvaise herbe et à envahir des habitats naturels ou être autrement dommageable pour l'environnement. De même, l'introduction d'un caractère nouveau peut modifier les pratiques agricoles et, de ce fait, avoir une incidence sur l'environnement. Précisons toutefois qu'une conclusion de "familiarité" ne permet pas d'établir le niveau précis de risque, mais signifie que l'on dispose d'informations suffisantes pour caractériser les dangers potentiels et faire une évaluation du risque.

Associé au concept de la "familiarité" est celui de l'évaluation comparative des risques et le fait que le risque pour l'environnement n'est pas déterminé par la nouveauté des éléments génétiques introduits dans une espèce végétale, mais par la nouveauté du végétal qui en résulte. L'objectif est de déterminer si le nouvel organisme présente un risque nouveau ou plus élevé que sa contrepartie classique, ou s'il peut être utilisé d'une manière interchangeable avec sa contrepartie classique sans avoir d'effet défavorable sur le milieu dans lequel il sera cultivé ou sur la santé humaine ou animale. L'objectif n'est pas d'établir un niveau absolu de sécurité, mais un niveau relatif de sécurité, afin d'avoir une certitude raisonnable qu'aucun risque inacceptable pour l'environnement ou la santé ne résultera de l'usage que l'on entend faire de la nouvelle plante transgénique. Des renseignements utiles peuvent être obtenus en déterminant si un caractère exprimé dans une plante modifiée génétiquement est comparable aux caractères déjà introduits dans cette espèce. À titre d'exemple, on peut évaluer l'incidence potentielle d'introduire dans l'environnement une plante transgénique tolérante aux herbicides, en examinant les effets qui ont été observés lorsque des variétés obtenues par les méthodes classiques de sélection, et possédant le même caractère de tolérance aux herbicides ou un caractère similaire, ont été disséminées dans l'environnement. Cependant, pour être en mesure d'appliquer une telle méthode comparative, il faut posséder suffisamment de données d'analyse (existantes ou nouvelles) pour établir une comparaison efficace entre le nouvel organisme et sa contrepartie traditionnelle. Il s'ensuit que cette démarche comporte une limite inhérente, si les données de base sont insuffisantes pour mesurer et évaluer les perturbations (positives ou négatives) résultant de l'introduction potentielle d'une plante transgénique.

Dans le cas des espèces végétales transgéniques, un outil de référence utile pour l'évaluation de la sécurité environnementale est une monographie détaillée décrivant la biologie de l'espèce à l'étude. En plus de déterminer les caractéristiques propres à l'espèce, cette monographie peut fournir des détails sur les interactions importantes entre le végétal et d'autres formes de vie qui doivent être prises en considération durant l'évaluation du risque. En général, un tel document inclut les renseignements suivants :

- la description taxonomique;
- la consommation et les utilisations de la culture;
- les méthodes de sélection et de production de semences et les pratiques agronomiques à l'échelle régionale/nationale;

- la biologie de la reproduction de la plante, y compris des détails sur la pollinisation, les mécanismes de dispersion du pollen et des graines et tout autre phénomène susceptible de donner lieu à la dispersion de gènes;
- la fréquence et la viabilité des hybrides intraspécifiques, interspécifiques et intergénériques;
- des détails sur les centres d'origine et la diversité génétique de l'espèce végétale;
- des détails sur la ploïdie de la culture, ses ascendants et toute espèce sexuellement compatible;
- la répartition et l'écologie des espèces apparentées ou des biotypes féraux, y compris tout élément de preuve d'envahissement;
- les maladies et ravageurs courants;
- les interactions possibles avec d'autres organismes, notamment les pollinisateurs, les champignons mycorhiziens, les animaux fureteurs, les oiseaux, ainsi que les microorganismes et les insectes du sol;
- la description taxonomique;
- la consommation et les utilisations de la culture;
- les méthodes de sélection et de production de semences et les pratiques agronomiques à l'échelle régionale/nationale;
- la biologie de la reproduction de la plante, y compris des détails sur la pollinisation, les mécanismes de dispersion du pollen et des graines et tout autre phénomène susceptible de donner lieu à la dispersion de gènes;
- la fréquence et la viabilité des hybrides intraspécifiques, interspécifiques et intergénériques;
- des détails sur les centres d'origine et la diversité génétique de l'espèce végétale;
- des détails sur la ploïdie de la culture, ses ascendants et toute espèce sexuellement compatible;
- la répartition et l'écologie des espèces apparentées ou des biotypes féraux, y compris tout élément de preuve d'envahissement;
- les maladies et ravageurs courants.

les interactions possibles avec d'autres organismes, notamment les pollinisateurs, les champignons mycorhiziens, les animaux fureteurs, les oiseaux, ainsi que les microorganismes et les insectes du sol.

4.A CATÉGORIES DE RENSEIGNEMENTS

Depuis sa création, en 1995, le Groupe de travail de l'OCDE sur l'harmonisation de la surveillance réglementaire en biotechnologie cherche à parvenir à des consensus sur les données devant servir à l'évaluation du risque et sur les méthodes d'analyse. Bien que la présentation diffère quelque peu, la majeure partie de l'information qui suit est extraite du plus récent rapport de ce groupe (OCDE, 2000).

4.A-1 Renseignements de base

Les catégories de renseignements qui suivent permettent de définir le contexte nécessaire à l'évaluation du risque pour l'environnement, en ciblant les caractères biologiques fondamentaux de l'organisme et ses interactions avec le milieu récepteur :

- **Organisme hôte** (tel que décrit précédemment);
- **Organisme donneur:** Il faut des éléments d'information sur l'histoire naturelle de l'organisme donneur, surtout si celui-ci ou d'autres organismes du même genre présentent normalement des caractéristiques de pathogénicité ou de toxicité environnementale ou d'autres caractères pouvant nuire à la salubrité de l'environnement ou à la santé humaine.
- **Le milieu récepteur probable:** Éléments d'information sur l'agroécosystème, y compris sur les pratiques agricoles actuellement utilisées pour l'espèce végétale (p. ex., méthodes de lutte contre les mauvaises herbes et les ravageurs, fumigation du sol et rotation des cultures). Ces renseignements fournissent d'importantes données de base qui permettent d'évaluer les effets, sur l'environnement, de l'introduction du végétal ou de la modification des pratiques agricoles.

4.A-2 Caractérisation du produit

- **Caractérisation génétique moléculaire:** L'OCDE n'a pas publié de norme sur la caractérisation moléculaire, si ce n'est d'indiquer que la stabilité génétique du caractère introduit doit être démontrée sur de multiples générations. Cette étape comporte habituellement une démonstration de la ségrégation intragénération du caractère introduit, conformément aux règles de l'hérédité mendélienne. Dans bien des cas, les renseignements sur la stabilité du caractère n'influent d'aucune façon sur l'évaluation du risque environnemental, mais ce n'est pas dans tous les cas. Par exemple, le maintien d'un niveau élevé d'expression des protéines insecticides de *Bt* fait partie intégrante de la stratégie "haute dose-refuge" actuellement utilisée pour gérer le développement potentiel de populations d'insectes résistants.

De nombreux pays ont aussi d'autres exigences, qui prévoient notamment la présentation d'éléments d'information sur la composition et l'intégrité de l'ADN inséré; le nombre de copies de l'ADN inséré; le nombre de sites d'insertion et le niveau d'expression de la (des) protéine(s) nouvelle(s) dans le temps et dans différents tissus. Ces exigences sont généralement justifiées du fait que la connaissance des gènes introduits ou modifiés, de leur régulation et du site d'intégration dans les plantes transgéniques peut fournir des éléments d'information sur les conséquences possibles, directes et indirectes, de la modification génétique.

- **Matériel exprimé:** Afin de pouvoir identifier les dangers par la caractérisation du produit, il faut savoir quels gènes introduits sont exprimés et connaître les caractéristiques, la concentration et la localisation des produits exprimés, ainsi que les conséquences de leur expression. Lorsque la modification donne lieu à l'expression d'une protéine nouvelle ou d'un polypeptide nouveau, ce matériau doit lui aussi être caractérisé quant à son identité, ses fonctions et, s'il y a lieu, sa similarité avec des produits de sources classiques. Il faut aussi tenir compte de la

possibilité d'une modification post traductionnelle (p. ex., d'une glycosylation) dans les systèmes eucaryotes, car ceci pourrait influencer le potentiel allergène.

- **Caractérisation phénotypique:** Le comportement agronomique et les caractéristiques phénotypiques des nouvelles plantes sont habituellement comparés à ceux d'une contrepartie classique. Outre les données sur le rendement et le comportement agronomique, les autres paramètres peuvent inclure la dormance et les taux de germination des semences, le délai de floraison ou la précocité, la hauteur et la vigueur des plantules, la date de libération du pollen et la sensibilité aux maladies. Ces données servent à évaluer les conséquences environnementales qui pourraient résulter de l'introduction du végétal, et particulièrement toute augmentation du risque d'envahissement ou de la compétitivité.

4.A-3 *Conséquences sur l'environnement*

- **Potentiel de transfert de gènes à des végétaux apparentés:** Le potentiel d'introgession de matériel génétique, d'une plante à une autre, est important lorsque certaines conditions sont réunies, par exemple lorsque deux plantes sont sexuellement compatibles, qu'elles se trouvent assez proches l'une de l'autre et que leurs descendants hybrides sont viables. Afin d'évaluer les risques potentiels pour l'environnement résultant de la pollinisation croisée avec des plantes transgéniques, il faut connaître la biologie de la reproduction de la plante ainsi que la distribution des espèces apparentées sexuellement compatibles; il faut aussi comprendre les effets du caractère introduit, s'il devait y avoir introgession dans d'autres espèces végétales. On peut trouver des renseignements à ce sujet dans des études sur la biologie des espèces végétales, des ouvrages scientifiques incluant des études sur la flore nationale ou régionale, ainsi qu'auprès d'agronomes vulgarisateurs et de malherbologistes. En général, l'évaluation du risque suppose que la plante transgénique à l'étude est capable de pollinisation croisée avec des espèces sexuellement compatibles, à moins que des données expérimentales rigoureuses ne prouvent le contraire (p. ex., la plante transgénique a été rendue infertile). Le risque pour l'environnement de l'introgession du caractère (c. à d. le danger environnemental potentiel) varie selon chaque combinaison plante/caractère et exige une évaluation au cas par cas, laquelle doit chercher à déterminer les conséquences potentielles découlant de la pollinisation croisée avec d'autres cultivars (EFSA, 2006). La dispersion et le flux génétique ne constituent pas en soi des dangers, et l'évaluation et le suivi des risques devraient être axés sur les conséquences imprévues de la culture des plantes transgéniques, comme l'augmentation du potentiel d'envahissement ou la modification de la dynamique des populations végétales ou des populations de biote associées aux cultures transgéniques.
- **Potentiel de transfert de gènes à des organismes non apparentés:** Ce type de transfert de gènes, désigné transmission horizontale de gènes, fait référence à l'échange non sexuel de matériel génétique entre des organismes appartenant à la même espèce ou à des espèces différentes. Il s'agit d'un phénomène naturel qui a été observé pour la première fois entre des bactéries, et dont l'importance dans l'évolution du génome procaryote a été déduite à partir de l'analyse phylogénétique. L'importance de ce phénomène en tant que risque dépend de la probabilité de transmission horizontale de gènes et de l'ampleur des effets

défavorables en découlant. Dans le cas des gènes marqueurs de la résistance aux antibiotiques qui ont été utilisés jusqu'à maintenant, la probabilité de transmission horizontale de gènes aux bactéries est extrêmement faible et ses conséquences – s'il devait y avoir transfert – ne seraient pas significatives. La prudence doit donc être tempérée par le fait que la transmission horizontale de gènes est un flux génétique naturel entre espèces qui est responsable des changements génétiques et que les transgènes qui sont intégrés d'une manière stable dans le génome nucléaire ne sont généralement pas plus susceptibles d'être transférés à d'autres organismes que d'autres gènes nucléaires. Aucune preuve scientifique ne justifie que l'on traite différemment les transferts possibles de gènes provenant d'organismes transgéniques des transferts mettant en cause des organismes naturels (Salyers, 1997).

- **Potentiel d'établissement et de persistance – envahissement en milieu agricole:** Les mauvaises herbes sont considérées comme un sous ensemble de végétaux pouvant être considérés comme nuisibles. L'expression "mauvaise herbe" est utilisée pour décrire un végétal qui constitue une nuisance dans des écosystèmes gérés, comme les exploitations agricoles ou les plantations forestières. Le potentiel d'envahissement mesure la capacité du végétal de coloniser avec succès un écosystème, en particulier lorsqu'il peut aussi causer le déplacement d'autres espèces. En général, le potentiel d'envahissement dépend de l'avantage sélectif de nombreux gènes qui fonctionnent en association et qui sont sans rapport avec les gènes habituellement introduits pour des raisons agronomiques. Cependant, les caractères qui améliorent la tolérance aux stress environnementaux comme la sécheresse, le froid ou la dormance peuvent augmenter la survie et la distribution des végétaux dans les écosystèmes gérés et naturels. De plus, les caractères qui confèrent une résistance aux stress biotiques jouant un rôle important dans l'écologie du végétal (p. ex., la résistance aux insectes ou aux pathogènes) pourraient permettre à la plante de devenir persistante ou envahissante, à l'intérieur et à l'extérieur de l'écosystème agricole.

Pour bon nombre des principales espèces végétales qui sont aujourd'hui cultivées dans le monde entier, le processus de domestication (sélection humaine, amélioration génétique et culture) a réduit leur valeur sélective inhérente et leur compétitivité face à leurs ascendants sauvages. Par exemple, des cultures comme le coton, le maïs et le soja ne sont généralement pas considérées comme des "mauvaises herbes" ou comme des espèces persistantes dans l'environnement, sans intervention humaine. L'expérience de la production de ces cultures dans l'environnement fournit de précieux renseignements pour l'évaluation du potentiel d'envahissement de la culture modifiée (c.-à-d. familiarité).

- **Effets indésirables secondaires et non visés potentiels:** L'évaluation du risque doit tenir compte des conséquences imprévues de la dissémination d'une plante transgénique dans l'environnement, et notamment de ses incidences possibles sur les pratiques et l'écosystème agricoles existants. Les renseignements sur la nature du caractère introduit servent à déterminer la probabilité d'effets non ciblés et, s'il y a lieu, l'éventail des organismes non ciblés à inclure dans les essais d'écotoxicité. En général, l'éventail des espèces sélectionnées pour les essais inclut les groupes fonctionnels qui suivent, lesquels sont présents dans les terres

agricoles et d'autres habitats : oiseaux, poissons d'eau douce, prédateurs et parasitoïdes des ravageurs des cultures, invertébrés du sol et pollinisateurs. Si des effets défavorables sont observés en laboratoire, des études sur le terrain doivent être entreprises pour évaluer l'abondance réelle des espèces non ciblées dans les conditions d'essais et les conditions témoin. Au champ, les insectes, par exemple, sont habituellement exposés à des doses de toxines plus faibles que celles utilisées pour les essais en laboratoire, en raison de leur alimentation et d'autres facteurs environnementaux au champ. Le choix des organismes indicateurs appropriés est fait en fonction de la possibilité d'exposition au champ à la protéine nouvelle exprimée dans les plantes transgéniques, ce qui dépend de la spécificité tissulaire de l'expression.

Les éléments d'information précités sont ensuite réunis pour intégrer l'identification du danger et l'estimation de l'exposition en vue de caractériser le risque potentiel.

D'autres préoccupations importantes doivent aussi être prises en considération, notamment l'accroissement possible, dans les populations d'insectes, de la résistance aux propriétés insecticides génétiquement modifiées (dans le cas de plantes exprimant des protéines insecticides), ainsi que les effets potentiels sur la biodiversité. À cet égard, il est important d'axer l'évaluation sur le milieu récepteur probable, lequel est d'abord un champ agricole, et d'établir une distinction entre la biodiversité des populations naturelles et celle des cultures et autres organismes à l'intérieur de l'agroécosystème.

Dans le modèle d'évaluation des risques de l'OCDE et le document d'orientation de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) sur l'évaluation des risques (EFSA, 2006), les facteurs éthiques et socioéconomiques ne sont pas explicitement pris en considération. On présume que ces considérations sont examinées ailleurs et qu'elles sont incluses dans le processus décisionnel, dans la mesure où le permettent les cadres juridiques et réglementaires de chaque pays.

5. PROTOCOLE DE CARTEGENA SUR LA PREVENTION DES RISQUES BIOTECHNOLOGIQUES

À l'échelle internationale, la nécessité d'assurer la biosécurité a été reconnue comme une priorité, par la Convention sur la diversité biologique de 1992, qui a été signée à Rio de Janeiro dans le cadre de la Conférence des Nations Unies sur l'environnement et le développement et elle est abordée, d'une manière plus détaillée, dans le chapitre 16 d'Action 21. Action 21 est un plan directeur en faveur du développement durable au XXI^e siècle, et le chapitre 16 exige des gouvernements qu'ils envisagent d'établir une coopération internationale en matière de "gestion écologiquement rationnelle des biotechniques" et d'adopter les mesures qui s'imposent pour assurer aux pays en développement une participation efficace aux activités de recherche en biotechnologie et un accès prioritaire aux résultats et aux avantages de la biotechnologie, et ce d'une manière juste et équitable.

L'adoption de cette Convention a notamment mené à l'élaboration du Protocole de Cartagena sur la prévention des risques biotechnologiques relatif à la Convention sur la biodiversité biologique (Protocole), lequel a été ratifié à Montréal le 29 janvier 2000 et

porte sur le transfert, la manipulation et l'utilisation sans danger des organismes vivants modifiés (OVM)³. En date du 10 août 2007, 141 pays avaient adhéré au Protocole entré en vigueur le 11 septembre 2003 ou l'avaient ratifié.

L'objectif du Protocole de Cartagena est de:

"contribuer à assurer un degré adéquat de protection pour le transfert, la manipulation et l'utilisation sans danger des organismes vivants modifiés résultant de la biotechnologie moderne qui peuvent avoir des effets défavorables sur la conservation et l'utilisation durable de la diversité biologique, compte tenu également des risques pour la santé humaine, en mettant plus précisément l'accent sur les mouvements transfrontières." (CBD, 2000)

L'article 15 du Protocole exige qu'une évaluation des risques fondée sur des méthodes scientifiques éprouvées soit entreprise pour appuyer les décisions concernant l'importation d'organismes vivants modifiés devant être disséminés dans l'environnement; cette évaluation doit permettre "de déterminer et d'évaluer les effets défavorables potentiels des organismes vivants modifiés sur la conservation et l'utilisation durable de la diversité biologique, compte tenu également des risques pour la santé humaine".

Le Protocole insiste sur la prise en considération de "méthodes d'évaluation des risques reconnues", y compris les directives des organisations internationales compétentes. Les principes du Protocole en matière d'évaluation des risques sont compatibles avec l'application du concept de familiarité comme principe général de l'évaluation comparative des risques. À titre d'exemple, le Protocole de Cartagena énonce le principe général suivant pour l'évaluation des risques associés aux organismes vivants modifiés :

*"Les risques associés aux organismes vivants modifiés ou aux produits qui en sont dérivés, à savoir le matériel transformé provenant d'organismes vivants modifiés qui contient des combinaisons nouvelles décelables de matériel génétique répliquable obtenu par le recours à la biotechnologie moderne, devraient être **considérés en regard des risques posés par les organismes récepteurs ou parents non modifiés** dans le milieu récepteur potentiel probable."⁴ (emphase ajoutée) (CBD, 2000)*

Le Protocole décrit à l'annexe III une méthode qui repose sur des principes de sécurité comparables à ceux définis par l'OCDE. Ainsi, en vertu du Protocole, l'évaluation des risques devrait comporter les étapes suivantes :

- l'identification de toutes nouvelles caractéristiques génotypiques et phénotypiques liées à l'organisme vivant modifié qui peuvent avoir des effets défavorables sur la diversité biologique dans le milieu récepteur potentiel probable, et comporter aussi des risques pour la santé humaine;
- l'évaluation de la probabilité que ces effets défavorables surviennent;

³ Un organisme vivant modifié s'entend de « tout organisme vivant possédant une combinaison de matériel génétique inédite obtenue par recours à la biotechnologie moderne ». Extrait du Protocole de Cartagena sur la prévention des risques biotechnologiques, article 3g).

⁴ Protocole de Cartagena sur la prévention des risques biotechnologiques, Annexe III.

- l'évaluation des conséquences qu'auraient ces effets défavorables s'ils survenaient;
- l'estimation du risque global (sur la base de ce qui précède);
- une recommandation quant à l'acceptabilité des risques identifiés, y compris, au besoin, la définition des stratégies d'atténuation des risques; et
- lorsqu'il existe des incertitudes quant à la gravité du risque, on peut exiger la conduite d'autres recherches ou la mise en place de mesures d'atténuation des risques ou de suivi de l'organisme vivant modifié dans le milieu récepteur.

En ce qui a trait aux aspects précis de la sécurité à évaluer, le Protocole de Cartagena se compare assez bien à un guide similaire publié par l'OCDE (Tableau 1).

Tableau 1 Comparaison des renseignements exigés par le Protocole de Cartagena et la directive de l'OCDE, aux fins de l'évaluation des risques

Cartagena Protocol on Biosafety	OECD Guidelines
Recipient (host) organism – biology, taxonomy, center(s) of origin, center(s) of diversity, common name, habitat	Host organism – reproductive biology, taxonomy, center(s) of origin, consumption/uses, interactions with other organisms, occurrence and viability of interspecific hybrids and anticipated changes in agronomic practices.
Intended use – including changes in use or practice compared with parental organism	
Donor organism(s) – biological characteristics, taxonomic status, common name and source	Donor organism(s) – known toxicological or pathogenicity concerns
Vector – identity, source, host range	Molecular genetic characterization – identity and source of genes and/or vectors; modification method; composition and integrity of introduced DNA; multigenerational stability (expression) and inheritance of the introduced trait; levels and tissue, or temporal, specificity of expression
Insert and characteristics of modification – genetic characteristics of inserted DNA and function	
LMO – identity of the LMO noting any differences between the biological characteristics of the LMO and the host organism	
Receiving environment – geographical, climatic and ecological considerations, including biological diversity	Establishment/persistence (weediness) – seed dissemination, dormancy, germination, competitiveness, disease resistance and stress tolerance
Detection and identification – suggested detection methods and their specificity, sensitivity and reliability	Gene transfer – both to other sexually compatible organisms and to unrelated species

Cependant, comme la prise de décisions réglementaires se fait toujours dans un contexte marqué d'une certaine incertitude, le Protocole laisse à la Partie le soin de déterminer ce qui constitue un degré d'incertitude scientifique acceptable ou inacceptable. Le paragraphe 10.6 stipule en effet ce qui suit : "*L'absence de certitude scientifique due à l'insuffisance des informations et connaissances scientifiques pertinentes concernant l'étendue des effets défavorables potentiels d'un organisme vivant modifié sur la conservation et l'utilisation durable de la diversité biologique dans la Partie importatrice, compte tenu également des risques pour la santé humaine, n'empêche pas cette Partie de prendre comme il convient une décision concernant l'importation de l'organisme vivant modifié en question..., pour éviter ou réduire au minimum ces effets défavorables potentiels*". Le paragraphe 8f) de l'annexe III donne plus de précisions sur les options que peuvent envisager les Parties en cas d'incertitude : "*Lorsqu'il existe des*

incertitudes quant à la gravité du risque, on peut demander un complément d'information sur des points précis préoccupants, ou mettre en œuvre des stratégies appropriées de gestion des risques et/ou contrôler l'organisme vivant modifié dans le milieu récepteur".

L'approche de précaution préconisée dans le Protocole (article 1) a fait l'objet d'une interprétation très large de la part des Parties. Aux fins de l'évaluation des risques environnementaux, il importe de rappeler que l'annexe III (article 4) stipule qu'il ne faut pas donner à l'absence de connaissances scientifiques une interprétation autre et en déduire "la gravité d'un risque, l'absence de risque ou l'existence d'un risque acceptable". Hill *et al.* (2004) concluent que l'approche de précaution et l'évaluation des risques proposées dans le Protocole sont cohérentes et notent que la confusion vient notamment des vues extrêmes selon lesquelles la précaution équivaut à la certitude absolue et que l'évaluation n'est d'aucune utilité lorsque la norme exige une certitude absolue.

Le Protocole traite en détails de la gestion du risque (article 16) et y fait aussi référence au paragraphe 8f) de l'annexe III (voir ci-dessus). Certains éléments de la gestion du risque, qui sont décrits à l'article 16, sont conformes aux principes décrits à la section 2, notamment lorsqu'il est dit que les mesures de gestion du risque devraient être fondées sur l'évaluation des risques (article 16.2).

Le Protocole offre également aux Parties la possibilité de tenir compte des facteurs socioéconomiques aux fins de l'évaluation des risques, notant que les Parties "*peuvent tenir compte, en accord avec leurs obligations internationales, des incidences socioéconomiques de l'impact des organismes vivants modifiés sur la conservation et l'utilisation durable de la diversité biologique, eu égard à la valeur de la diversité biologique pour les communautés autochtones et locales, en particulier*" (article 26).

L'article 26 du Protocole manque toutefois de précision sur les questions socioéconomiques qui peuvent être prises en compte dans le processus décisionnel et offre peu de conseils sur la manière de considérer ces préoccupations. Il semble toutefois que l'article 26 reconnaisse également que les Parties peuvent être assujetties à certaines obligations, en vertu d'autres accords qui doivent aussi influencer la prise de décisions (p. ex., l'Accord sur l'application des mesures sanitaires et phytosanitaires). On peut s'attendre à ce que les discussions à ce sujet se poursuivent, car l'OMC n'accepte pas que les préoccupations socioéconomiques entrent dans l'évaluation des risques associés à l'exportation de cultures traditionnelles qui pourraient saper les cultures et les traditions locales dans les pays importateurs.

Les dispositions à caractère socioéconomique du Protocole pourraient n'être prises en considération que pour évaluer les conséquences économiques, directes ou indirectes, de l'introduction dans l'environnement d'un organisme vivant modifié. On pourrait, par exemple, tenir compte des conséquences économiques – s'il en est – résultant de la perte de la biodiversité ou des coûts occasionnés par la restauration de l'environnement ou l'intensification du suivi, mais non des incidences économiques sur le commerce ou l'emploi en général.

6. CONVENTION INTERNATIONALE POUR LA PROTECTION DES VEGETAUX

La Convention internationale pour la protection des végétaux (CIPV), établie sous l'égide de la FAO, est reconnue dans l'Accord de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) sur les mesures sanitaires et phytosanitaires comme un outil multilatéral visant à prévenir l'introduction et la propagation de phytoravageurs⁵ et de maladies des plantes, par l'établissement de normes phytosanitaires et de mesures de lutte harmonisées. Bien que la CIPV soit un accord international ayant force obligatoire, les normes élaborées et adoptées sous l'égide de la Convention ne le sont pas. Les membres de l'OMC sont toutefois tenus de fonder leurs mesures phytosanitaires sur des normes internationales élaborées en accord avec la CIPV, et on présume que les mesures phytosanitaires conformes à la Norme internationale pour les mesures phytosanitaires (NIMP) sont compatibles avec les dispositions pertinentes de l'Accord sur l'application des mesures sanitaires et phytosanitaires. Le spectre complet des organismes nuisibles couverts par la CIPV va au-delà des ravageurs qui s'attaquent directement aux plantes cultivées et inclut les mauvaises herbes et d'autres espèces qui ont des effets indirects sur les végétaux, y compris la flore sauvage. Tout comme la Convention sur la diversité biologique, la CIPV a pour but de protéger l'environnement et la biodiversité contre l'introduction d'espèces étrangères. Les dispositions et les normes actuelles de la CIPV établissent une assise solide et encouragent fortement la mise en œuvre de normes internationales pour se protéger contre l'introduction d'espèces exotiques, conformément au paragraphe 8h) de la Convention sur la diversité biologique⁶. En ce qui concerne le Protocole, il a été établi que les organismes vivants modifiés peuvent aussi devenir des espèces envahissantes et être considérés comme des organismes nuisibles pour les végétaux dans certaines circonstances.

Plus récemment, la Commission intérimaire des mesures phytosanitaires (CIMP)⁷ a soutenu les déclarations concernant le rôle de la CIPV à l'égard des organismes vivants modifiés⁸. La Commission a notamment reconnu le mandat de la CIPV relativement à la protection des végétaux et aux préoccupations suscitées par les phytoravageurs, y compris l'introduction d'organismes vivants modifiés. Elle note également que la CIPV a harmonisé les démarches relatives aux mesures phytosanitaires, à l'analyse des risques et à la gestion des risques, et que ces outils conviennent à l'évaluation et à la gestion des risques associés à l'introduction d'organismes vivants modifiés. Enfin, en ce qui a trait au rôle de la CIPV relativement aux organismes vivants modifiés, la Commission intérimaire a convenu qu'un groupe de travail à composition non limitée serait chargé d'élaborer des directives détaillées sur l'analyse du risque phytosanitaire (ARP) lié aux organismes vivants modifiés, pour guider le commerce de ces organismes et les risques phytosanitaires qui pourraient y être associés.

⁵ Toute espèce, souche ou biotype de végétal, d'animal ou d'agent pathogène nuisible pour les végétaux ou produits végétaux. FAO (1990); version révisée, FAO (1995); IPPC (1997).

⁶ *Report of the Consultation on IPPC – CBD Cooperation*. Commission intérimaire des mesures phytosanitaires, 6-8 fév. 2001. Bangkok.

⁷ Les modifications proposées en 1997 à la CIPV incluent une disposition concernant la mise sur pied d'une commission des mesures phytosanitaires pour promouvoir la mise en œuvre intégrale des objectifs de la Convention. En attendant que ces modifications entrent en vigueur, la commission proposée est précédée par la Commission intérimaire des mesures phytosanitaires (CIMP). Tous les pays membres et parties contractantes de la FAO peuvent faire partie de la CIMP.

⁸ *Report of the ICPM Open-ended Working Group on Specifications for an International Standard for Phytosanitary Measures on Living Modified Organisms*. Commission intérimaire des mesures phytosanitaires, sept. 2001.

En avril 2004, la Commission intérimaire a donné son aval à un supplément sur l'analyse du risque phytosanitaire pour les organismes vivants modifiés et convenu que ce supplément serait intégré à la Norme internationale pour les mesures phytosanitaires (NIMP) n° 11 (FAO, 2004). Ce supplément décrit en détail un processus en trois étapes, lequel comprend la mise en route, l'évaluation du risque phytosanitaire et la gestion du risque. La NIMP n° 11 couvre l'analyse des risques que présentent les phytoravageurs pour l'environnement et la biodiversité, y compris les risques pour les plantes non cultivées ou naturelles, la flore sauvage, ainsi que les habitats et les écosystèmes à l'intérieur de la zone ARP⁹. Le supplément ne modifie pas la portée de la NIMP n° 11, mais vise à clarifier les questions liées à l'analyse du risque phytosanitaire pour les organismes vivants modifiés.

Il est également reconnu que, bien que bon nombre d'organismes vivants modifiés ne seront pas caractérisés comme des organismes nuisibles, certains peuvent présenter des risques phytosanitaires et donc justifier la conduite d'une ARP. Aussi l'objectif de l'étape de mise en route est-il d'identifier les OVM qui présentent des caractéristiques d'organismes nuisibles potentiels et qui devraient faire l'objet d'une évaluation plus poussée. À titre d'exemple, la modification des caractéristiques adaptatives (p. ex., la tolérance à la sécheresse ou à d'autres stress abiotiques, la tolérance aux pesticides, la résistance aux maladies ou l'altération de la biologie de la reproduction ou de la dissémination des graines) pourrait accroître le potentiel d'introduction ou de dissémination, y compris le potentiel d'envahissement de la plante. Dans le cas des OVM, l'étape d'évaluation du risque proposée dans l'ARP inclut une évaluation d'un grand nombre des facteurs de risque prévus aux fins de l'évaluation des risques dans le Protocole de Cartagena ou la directive de l'OCDE.

Il est toutefois un point sur lequel l'analyse du risque phytosanitaire prévue en vertu de la CIPV s'écarte sensiblement des autres processus d'évaluation : il s'agit de l'évaluation explicite des conséquences économiques potentielles, ces conséquences faisant référence aux effets directs et indirects des organismes nuisibles. Les effets directs incluent par exemple les pertes de récolte, les coûts occasionnés par la mise en œuvre de mesures de lutte contre les ravageurs, les effets sur les pratiques de production existantes ou encore la réduction, le déplacement ou l'élimination d'autres espèces végétales. Les conséquences économiques indirectes peuvent inclure les effets sur les marchés intérieurs et d'exportation (y compris l'accès aux marchés d'importation et d'exportation), les ressources devant être allouées pour poursuivre les recherches ou formuler des conseils, ainsi que les effets à caractère social ou autre (p. ex., le tourisme).

Voici quelques exemples d'effets indirects causés par les organismes nuisibles qui pourraient être considérés pour l'analyse des risques environnementaux :

- effets significatifs sur les communautés végétales;
- effets significatifs sur des zones écosensibles ou protégées désignées;
- modification significative des processus écologiques et de la structure ou de la stabilité des écosystèmes (y compris d'autres effets sur les espèces végétales,

⁹ La zone ARP peut désigner la totalité d'un pays, une partie d'un pays ou la totalité ou certaines parties de plusieurs pays, identifiées officiellement. FAO, 1995; CEPM, 1999; d'après l'Accord de l'OMC sur l'application des mesures sanitaires et phytosanitaires.

- l'érosion, la modification du niveau des nappes phréatiques, l'augmentation du risque d'incendie, le recyclage des éléments nutritifs, etc.);
- effets sur l'usage par l'homme (p. ex., qualité de l'eau, usages récréatifs, tourisme, mise au pâturage, chasse, pêche), et
 - coûts de la restauration de l'environnement.

Quant aux organismes vivants modifiés, l'incidence économique devrait être évaluée en fonction de leur potentiel d'organisme nuisible (c.-à-d. nuisible pour les végétaux ou produits végétaux); l'examen des effets directs sur la santé humaine ou animale déborde donc du champ d'application de cette norme¹⁰.

La CIPV prévoit généralement que les conséquences défavorables des organismes nuisibles des végétaux, y compris ceux touchant les espèces végétales non cultivées ou non gérées, la flore sauvage, les habitats et les écosystèmes, se mesurent en termes économiques¹¹. En plus de tenir compte des dommages économiques qualitatifs et quantitatifs, le processus d'analyse du risque phytosanitaire de la CIPV prévoit également une évaluation des avantages économiques potentiels. Les coûts et les avantages peuvent être pris en considération, qu'ils soient le résultat direct ou indirect de l'introduction d'un organisme nuisible ou d'un enchaînement causal.

Enfin, la dernière étape du processus d'ARP prévu dans la CIPV consiste à évaluer l'acceptabilité du risque (phytosanitaire et économique) et à déterminer les options de gestion du risque appropriées. Outre les mesures d'interdiction qui s'appliquent aux organismes nuisibles, d'autres mesures pourraient être adoptées à l'égard des organismes vivants modifiés, notamment des plans de gestion de la résistance des organismes nuisibles, le contrôle de l'expression du caractère nouveau ou de la capacité de reproduction (p. ex., stérilité des mâles), ou la mise en place d'un système de surveillance post-approbation. En vertu de la CIPV, la principe de "modification" stipule ce qui suit : *"Les mesures phytosanitaires doivent être modifiées sans délais, en fonction de l'évolution de la situation et des nouvelles données scientifiques disponibles, soit en y ajoutant des interdictions, des restrictions ou des conditions visant à assurer leur efficacité, soit en retirant les interdictions, restrictions ou conditions jugées inutiles"*¹². Par conséquent, l'imposition d'une interdiction ou d'une condition particulière ne devrait pas *a priori* être considérée comme une mesure permanente, mais plutôt comme une mesure provisoire en attendant les résultats d'autres recherches ou d'activités de surveillance, ou l'évolution des circonstances.

¹⁰ En vertu de l'Accord sur l'application des mesures sanitaires et phytosanitaires, la Commission du Codex Alimentarius doit veiller au maintien de normes internationales en matière de salubrité alimentaire qui soient reconnues par l'OMC et déterminer si les mesures nationales s'appuient suffisamment sur des principes scientifiques éprouvés pour respecter les règles de l'OMC.

¹¹ L'incidence économique est définie dans la NIMP n° 5 : Glossaire des termes phytosanitaires, Supplément n° 2 : Directives pour la compréhension de l'expression importance économique potentielle et d'autres termes apparentés. FAO, Rome.

¹² NIMP n° 1 : Principes de quarantaine végétale liés au commerce international. FAO, Rome.

ÉTUDE DE CAS SUR LA LIGNÉE DE COTON MON 15985

7. INTRODUCTION À L'ÉTUDE DE CAS

La présente étude de cas a été préparée pour offrir aux évaluateurs des risques un outil pratique illustrant l'application des concepts de l'évaluation des risques énoncés dans les sections qui précèdent. Pour l'élaboration de cet outil de formation, la société Monsanto a généreusement consenti à ce que soient utilisés certains éléments d'information qu'elle avait présentés dans ses soumissions réglementaires en vue de l'approbation de la lignée de coton transgénique résistant aux insectes MON 15985 (Bollgard II®). Il convient cependant de noter que certaines libertés ont été prises dans le traitement des renseignements fournis dans les demandes initiales, afin d'accroître l'utilité de l'étude de cas comme outil de formation. Certains éléments d'information ont ainsi été réduits à un traitement sommaire et les données étayant la présente étude de cas ne représentent qu'une partie des renseignements fournis. L'étude de cas ne constitue pas une demande complète, ni ne doit être considérée comme une évaluation complète du risque. L'utilisation de ces données comme outil de formation ne constitue pas non plus un appui en faveur de ces données ou du produit, ni ne doit être considérée comme une critique sur l'une ou l'autre des soumissions initiales.

La lignée de coton transgénique MON 15985 (identificateur unique de l'OCDE MON-15985-7) est issue de la transformation biolistique du coton Bollgard® (identificateur de l'OCDE MON-ØØ531-6), et son ADN contient le gène *cry2Ab* dérivé de *Bacillus thuringiensis*. La lignée de coton MON 15985 produit deux protéines insecticides, Cry1Ac et Cry2Ab, qui confèrent une protection contre un éventail d'espèces de lépidoptères, dont la noctuelle verdoyante (*Heliothis virescens*), le ver rose de la capsule du cotonnier (*Pectinophora gossypiella*), le ver de la capsule du coton (*Helicoverpa zea*), la fausse-arpenteuse du chou (*Trichoplusia ni*), la chenille de marais salants (*Estigmene acrea*), la squeletteuse du cotonnier (*Bucculatrix thurbeiella*), l'arpenteuse du soja (*Pseudoplusia includens*), le légionnaire de la betterave (*Spodoptera exigua*), le légionnaire d'automne (*Spodoptera frugiperda*), le légionnaire à bandes jaunes (*Spodoptera ornithogolli*) et la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*).

La lignée de coton MON 15985 a été déréglementée pour la première fois aux États-Unis en 2002 et, depuis, sa culture générale (commerciale) a été autorisée en Australie, en Inde et en Afrique du Sud. De plus, plusieurs autres pays ont autorisé l'utilisation de produits dérivés de la lignée de coton MON 15985 (p. ex., huile raffinée, tourteau de graines de coton), pour l'alimentation animale ou humaine. Ces pays incluent le Canada, l'Union européenne, le Japon, la Corée, le Mexique et les Philippines (Tableau 2).

Tableau 2 Résumé des autorisations réglementaires à l'égard de la lignée de coton MON 15985 (juin 2007)

Country	Environment (Year)	Food and/or Feed (Year)	Food (Year)	Feed (Year)
Australia	2002		2002	
Canada			2003	2003
European Union		2005		
India	2006			
Japan			2002	2003
Korea			2003	2004
Mexico		2003		
Philippines			2003	2003
South Africa	2003			
United States	2002		2002	

Notes:

Australia: Commercial production limited to New South Wales and southern Queensland.

Canada: Not grown in Canada. Not subject to variety registration.

European Union: Notified as an existing product on 18 April 2005.

Les données présentées dans les paragraphes qui suivent, à l'appui de la sécurité environnementale de la lignée de coton MON 15985, ont été regroupées conformément aux catégories énoncées à la section 4.A. Comme nous l'avons indiqué précédemment, ces données concernent essentiellement les questions liées à l'évaluation des risques environnementaux des plantes transgéniques et ne tiennent pas compte expressément des questions additionnelles concernant la salubrité des produits dérivés pour l'alimentation humaine ou animale.

8. RENSEIGNEMENTS DE BASE

Afin de pouvoir évaluer la sécurité d'une plante transgénique pour l'environnement, il faut se familiariser avec la biologie de la plante proprement dite, ainsi qu'avec les pratiques agricoles ou sylvicoles utilisées pour sa culture.

8.A L'ORGANISME HÔTE

Nous présentons ci-après une brève description de l'organisme hôte, *Gossypium hirsutum* (coton), et plus particulièrement de sa biologie de reproduction. Dans la mesure du possible, des renseignements pertinents sur la biologie, la culture et l'usage du coton en Afrique sont aussi présentés.

8.A-1 Description taxonomique

Le coton fait référence à quatre espèces du genre *Gossypium*, dans la famille des Malvacées, soit *G. hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L. et *G. herbaceum* L. – lesquelles ont été domestiquées séparément comme source de fibre textile (Brubaker *et al.*, 1999). À l'échelle mondiale, le genre *Gossypium* compte quelque 50 espèces (Brubaker *et al.*, 1999), dont 18 sont présentes au Mexique, 14 dans le nord-est de l'Afrique et en Arabie et 17 en Australie.

La majeure partie du coton cultivé à des fins commerciales appartient à l'une des deux espèces suivantes : *G. hirsutum* (coton Upland – 90 % des plantations mondiales) et *G. barbadense* (coton Pima ou longue-soie qui représente 3 % de la production mondiale). L'espèce *Gossypium hirsutum* est cultivée au Burkina Faso, en Tanzanie et au

Kenya, mais *G. barbadense* contribue peu à la production de coton. Deux autres espèces – *G. arboreum* et *G. herbaceum* – sont cultivées en Asie, mais ne font pas l'objet d'une culture commerciale en Afrique occidentale ou orientale.

8.A-2 Centres d'origine et diversité génétique du coton

Les données sur les séquences d'ADN des espèces *Gossypium* existant encore laissent croire que le genre est apparu il y a dix à vingt millions d'années (Wendel et Albert, 1992; Seelanan *et al.*, 1997). Le centre d'origine géographique du genre n'a pas encore été déterminé, mais on sait que celui-ci s'est dispersé dans un certain nombre de centres géographiques diversifiés, dont l'Afrique et l'Arabie, l'Australie et la région méso-américaine (Pérou, Équateur, Bolivie). À l'échelle mondiale, le genre *Gossypium* compte quelque 50 espèces (Brubaker *et al.*, 1999). Bien que le lieu d'origine du genre demeure inconnu, on sait que les principaux centres de diversité du genre sont le centre-ouest et le sud du Mexique (18 espèces), le nord-est de l'Afrique et de l'Arabie (14 espèces) et l'Australie (17 espèces).

8.A-3 Ploidie du coton, de ses ascendants et des espèces sexuellement compatibles

Les 50 espèces du genre *Gossypium* diffèrent considérablement quant à leur morphologie, leur écologie et leur physiologie, et l'évolution de ces différences s'est accompagnée d'une importante évolution chromosomique. On compte aujourd'hui 45 espèces diploïdes ($2n = 26$) et cinq espèces allotétraploïdes réparties entre huit génomes connus : les génomes A, B, E et F sont présents en Afrique, en Arabie et en Asie, tandis que les génomes C, G et K se trouvent en Australie et que le génome D est présent dans le Nouveau Monde. Le génome AD est issu de l'hybridation des génomes A et D qui a donné des espèces allotétraploïdes.

G. hirsutum et *G. barbadense* sont deux espèces allotétraploïdes, qui contiennent deux génomes : A et D. Selon l'hypothèse actuellement avancée, les génomes A et D ont dû se trouver à proximité l'un de l'autre, à un certain moment dans l'histoire de la Terre, bien qu'un océan les sépare aujourd'hui (le génome A se trouve en Afrique et en Arabie et le génome D est présent au Mexique). Les données moléculaires indiquent que l'hybridation qui a donné naissance aux espèces allotétraploïdes s'est produite il y a un à deux millions d'années. Parmi les autres membres possédant le génome AD, mentionnons les espèces *G. mustelinum* (présente dans une région éloignée du nord du Brésil), *G. darwinii* (uniquement présente sur les îles Galapagos) et *G. tomentosum* (îles Hawaï). *G. hirsutum* et *G. barbadense* ont une large aire de distribution qui inclut l'Amérique centrale et du Sud, les Caraïbes ainsi que les îles Salomon et Marquises du Pacifique. On croit que l'isthme de Tehuantepec serait le point d'origine des espèces allotétraploïdes AD.

Le modèle vivant qui se rapprocherait le plus du donneur paternel du génome D ayant mené au complexe AD serait l'espèce *G. raimondii*, présente au Pérou. Un autre donneur possible du génome D est *G. gossypoides*. On ignore toutefois de quelle espèce provient le génome A, car on croit que les ascendants ont aujourd'hui disparu. On sait toutefois que le génome de *G. herbaceum* se rapproche plus du subgénome A présent dans les espèces allotétraploïdes que l'autre membre du génome A, *G. arboreum*.

8.A-4 Sélection du coton, production de graines et pratiques agronomiques

À l'état sauvage, *G. hirsutum* est un arbuste vivace qui atteint environ 1,5 mètre de hauteur. En production commerciale, *G. hirsutum* est cultivé en annuelle et les plants

sont détruits après la récolte des fruits pour la production de fibres et de graines. Dans certaines régions, les repousses de coton sont utilisées pour une deuxième saison, mais d'autres régions interdisent strictement cette pratique, car on croit qu'elle aggraverait l'action des organismes nuisibles. Le coton est cultivé, soit en culture sèche qui dépend des précipitations, soit en culture irriguée, lorsqu'on dispose d'un approvisionnement en eau suffisant.

La culture du coton inclut généralement la préparation du sol, les semis, le contrôle des mauvaises herbes, la lutte contre les organismes nuisibles et l'arrosage durant la saison de croissance. Les producteurs de coton peuvent aussi planter d'autres cultures durant la contre-saison. La période de culture du coton varie selon le climat; le coton est semé lorsque la température du sol atteint 14 °C à une profondeur de 10 cm, pendant au moins trois jours.

Sur le plan agronomique, la culture du coton peut être divisée en trois phases clés du développement, soit la germination et l'établissement des semis; le développement de la surface foliaire et du couvert; et la reproduction et dissémination. La durée totale de développement, depuis la germination jusqu'à la maturation du premier fruit, est d'environ 15 à 17 semaines, bien que la durée puisse fluctuer en fonction de la température et d'autres variables environnementales. Le Tableau 3 présente les principaux stades de croissance du coton aux États-Unis.

Tableau 3 Stades de croissance du coton (BIO, 2006)

Growth Stage	DD60's (GDDs)	Nodes	Days after planting
Emergence	50	0	5 – 15
4th true leaf	250	4	20 – 30
1st square (pinhead)	350 – 450	5 – 8	30 – 45
1st bloom	800 – 850	15 – 18	50 – 80
Cutout	1300 – 1500	20 – 24	80 – 120
Defoliation	1800 – 2000	21 – 28	120 – 170
Harvest	1900 – 2600	21 – 30	130 – 180

8.A-5 Consommation et utilisations du coton

Le coton est cultivé principalement pour ses capsules qui produisent les fibres – matière première de nombreux produits textiles. Les graines de coton représentent près des deux tiers du coton récolté, celles-ci étant séparées de la fibre durant l'égrenage. Les graines de coton sont ensuite triturées pour produire de l'huile de coton, du tourteau de graines de coton et des balles. L'huile de graines de coton est utilisée principalement comme huile de cuisson, dans les shortening et les sauces pour salade, et elle est aussi largement utilisée pour la préparation de grignotines telles craquelins, biscuits et croustilles. Le tourteau sert de source de nourriture dans certains pays; le tourteau et les balles sont également d'importants concentrés protéiques utilisés pour l'alimentation du bétail et ils peuvent aussi être utilisés comme litière ou combustible. Les linters, ou peluches, qui ne sont pas éliminés durant l'égrenage sont utilisés pour la fabrication de feutres, de rembourrage, de matelas, de ficelle, de mèches, de tapis et de coton chirurgical, ainsi que de produits industriels comme la rayonne, des pellicules, le verre incassable, des plastiques, des boyaux à saucisse, des vernis-laques et des explosifs cellulosiques.

8.A-6 Biologie de la reproduction

Morphologie des fleurs:

Gossypium spp. présentent des fleurs hermaphrodites solitaires complètes, à symétrie axiale, qui commencent à se former de quatre à cinq semaines après les semis (Watson et Dallwitz, 1992; Oosterhuis et Jernstedt, 1999; Macfarlane *et al.*, 2002). Les boutons floraux se forment à l'apex et fleurissent environ 25 jours après leur formation. La floraison suit un modèle particulier : les premières fleurs s'ouvrent dans le bas du plant, à la première position sur la branche fructifère puis, environ trois jours plus tard, une autre fleur s'ouvre sur la branche fructifère suivante, à la même position. Environ six jours après l'ouverture de la première fleur sur une branche, une deuxième fleur s'ouvre sur la même branche. Ce processus se poursuit jusqu'à la défoliation ou le premier gel, à la condition que la plante continue de croître. Les fleurs s'ouvrent à l'aube et ne restent ouvertes qu'une journée (Oosterhuis et Jernstedt, 1999). Les fleurs de *G. hirsutum* sont de couleur blanc crème à l'ouverture, mais deviennent rose rouge le lendemain, après l'anthèse et la pollinisation (Oosterhuis et Jernstedt, 1999).

Les fleurs se composent d'un calice, d'une corolle, d'un androcée et d'un gynécée compris dans trois bractées photosynthétiques, avec trois à six nectaires situés à la base des bractées (Watson et Dallwitz, 1992; Oosterhuis et Jernstedt, 1999; Macfarlane *et al.*, 2002). Le calice lobé présente cinq sépales fusionnés sur presque toute leur longueur (Oosterhuis et Jernstedt, 1999). La corolle est gamopétale, ses cinq pétales étant soudés à la base (Oosterhuis et Jernstedt, 1999).

L'androcée, ou organe mâle, est composé d'un tube staminal qui entoure le style. Il contient un nombre indéfini (entre 50 et 100) d'étamines uniloculaires. Les étamines, qui se présentent par paires, sont elles aussi soudées sur la majeure partie de la longueur de leur filament (Oosterhuis et Jernstedt, 1999; Macfarlane *et al.*, 2002). Le gynécée, ou organe femelle, est composé d'un ovaire supère, d'un style apical simple et unique et d'un stigmate de deux à cinq lobes (Oosterhuis et Jernstedt, 1999). L'ovaire est constitué de trois à cinq carpelles syncarpés, chacun formant une loge. Chaque loge contient de huit à dix ovaires, mais chacune ne produira qu'environ huit graines (Oosterhuis et Jernstedt, 1999).

Pollen et pollinisation:

Peu après l'anthèse, il y a déhiscence des anthères des fleurs de coton, qui libèrent ainsi leur pollen. Le pollen de coton est relativement gros et lourd et n'est pas facilement disséminé par le vent (Jenkins, 1992). Le coton se reproduit par autofécondation facultative et pollinisation croisée opportuniste en présence d'insectes pollinisateurs (Oosterhuis et Jernstedt, 1999). Le pollen du coton demeure viable pendant environ 12 heures (Govila et Rao, 1969). La fécondation des ovules se produit de 12 à 30 heures après la pollinisation.

Les fleurs de *G. hirsutum* sont entomophiles, c.-à-d. attractives pour les insectes. La pollinisation se fait, soit par dissémination par les insectes, soit par auto-fécondation, car le pollen est trop lourd et collant pour être transporté par le vent (Llewellyn et Fitt, 1996). Les insectes pollinisateurs appartiennent essentiellement à l'ordre des hyménoptères, les genres *Bombus* spp. (bourdons) et *Apis* spp. (abeilles domestiques) étant les plus importants (Umbeck *et al.*, 1991). En présence d'insectes vecteurs, la pollinisation croisée peut atteindre jusqu'à 50 à 80 % dans un champ.

Pollinisation croisée:

Dans le cas du coton, le taux de pollinisation croisée est fortement tributaire de la prévalence des insectes (Elfawal *et al.*, 1976; Moresco *et al.*, 1999) et il varie en fonction de l'emplacement et de la période (Moffett *et al.*, 1975; Elfawal *et al.*, 1976; Moffett *et al.*, 1976). Les taux de visite par les insectes peuvent toutefois surestimer le taux de pollinisation croisée, car un grand nombre de pollinisateurs potentiels préféreront le nectaire au pollen (Moffett *et al.*, 1975; Rao *et al.*, 1996). Ainsi, selon un grand nombre d'estimations au champ, le taux de pollinisation croisée est au plus de 10 % (Meredith et Bridge, 1973; Gridley, 1974; Theron et van Staden, 1975; Elfawal *et al.*, 1976; Umbeck *et al.*, 1991; Llewellyn et Fitt, 1996), bien que des taux plus élevés (16,5 % à 25 %) aient été signalés dans certains cas (Smith, 1976; Moresco *et al.*, 1999).

Par ailleurs, la fréquence de la pollinisation croisée diminue parallèlement à la distance de la source de pollen. Umbeck *et al.* (1991) ont utilisé un marqueur de sélection pour examiner la pollinisation à partir d'une source de coton transgénique d'une superficie de 30 m × 136 m. Ils ont constaté que la pollinisation croisée diminuait de cinq à moins de un pour cent, à des distances respectives de un à sept mètres de la parcelle source, et qu'un faible taux de pollinisation croisée (moins de un pour cent) était détecté sporadiquement à la distance maximale d'échantillonnage (25 m). Dans le cadre d'une étude réalisée selon différents plans, Llewellyn et Fitt (1996) ont eux aussi observé de faibles taux de pollinisation croisée dans le coton, ce taux diminuant à moins de 0,3 % à une distance de 16 m de la source. Enfin, selon Berkey *et al.* (2002), le taux de pollinisation croisée entre des champs séparés par une route de 4 m est passé de 1,89 % dans la rangée la plus près de la source, à 0 % à quelque 23,2 m à l'intérieur du champ d'essai.

Ces faibles taux de pollinisation croisée ont été corroborés par des essais en champs confinés, réalisés au Burkina Faso sur la lignée MON 15985 (Tableau 4).

Tableau 4 Fréquences de pollinisation croisée de MON 15985 au Burkina Faso

Distance (m)	Border Unsprayed ¹	Border Sprayed ²
2	5.50%	8.30%
5	1.90%	4.20%
10	0.80%	5%
15	0.40%	0%

1. The border of the field was unsprayed with insecticide. N=4140

2. The border of the field was sprayed with insecticide. N=120

Développement des fruits:

La croissance et le développement des fruits du coton, ou capsules, commencent immédiatement après la fécondation, bien que la croissance la plus rapide se produise après environ 7 à 18 jours (Oosterhuis et Jernstedt, 1999). Durant leur développement, les capsules ont une forme sphérique à ovoïde et sont de couleur vert pâle. Les capsules atteignent leur taille maximale environ 25 jours après la fécondation et parviennent à maturité complète quelque 20 jours plus tard. À maturité, les capsules sont épaisses et coriaces et elles sèchent rapidement, pour devenir brunes et cassantes. Souvent, ces fruits s'ouvrent et exposent les graines et les fibres qui y sont associées.

Morphologie des graines:

Le coton est cultivé principalement pour ses fibres, qui sont produites par les cellules épidermiques du tégument de la graine. Avant l'égrenage et le délintage, le tégument porte deux types de fibres : des fibres longues et pelucheuses, appréciées de l'industrie du textile, et des fibres courtes et duveteuses – ou linters – utilisées pour la fabrication de divers produits, y compris des aliments. Après l'égrenage, les graines de coton sont encore recouvertes de linters, d'où leur nom de "graines duveteuses". Les graines de coton ont une forme ovoïde légèrement pointue, mesurent environ 10 mm de longueur sur 4 mm de largeur et sont de couleur brun foncé ("graines noires"). Chaque capsule produit de 20 à 25 graines.

Dissémination des graines:

Comme le coton ne se reproduit habituellement pas par multiplication végétative (Serdy *et al.*, 1995), sa propagation dans l'environnement résulte de la dissémination des graines. La dissémination des graines de coton est un phénomène physique. Selon les observations recueillies sur les graines disséminées et les resemis dans le cadre d'essais sur le coton réalisés dans le nord de l'Australie, les graines noires ayant subi un délintage sont celles qui présentent le plus faible risque de propagation accidentelle dans l'environnement (OGTR, 2002). Lorsqu'il y a dissémination de graines noires, c'est qu'il y a eu déversement accidentel durant les semis, dans les zones de production du coton.

Les graines duveteuses sont habituellement utilisées pour l'alimentation du bétail; elles présentent donc un potentiel élevé de dissémination hors des zones de production du coton. Le coton-graine non traité, sur lequel les fibres demeurent toutes fixées au tégument, présente lui aussi un potentiel élevé de dissémination dans l'environnement. De fait, les données de Monsanto (OGTR, 2002) semblent indiquer une fréquence assez élevée de repousses à partir de coton-graine disséminé, dans les canaux d'irrigation et de drainage et le long des routes. L'établissement de repousses le long des routes a fort probablement été causé par le déversement accidentel de coton-graine durant le transport des modules de coton, de l'entrepôt à l'égreneuse.

Après leur dissémination, les graines qui ne germent pas seront probablement éliminées par les prédateurs de graines ou pourriront, plutôt que d'être intégrées dans une banque de semences persistantes dans le sol.

Apparition d'hybrides intraspécifiques ou interspécifique:

La pollinisation croisée par les insectes, entre des plantes de l'espèce *G. hirsutum*, constitue le mode le plus probable de dissémination des gènes du coton dans l'environnement. Il peut également y avoir transfert de gènes entre des plants adjacents de *G. hirsutum*, bien que cela soit relativement peu fréquent. Llewellyn et Fitt (1996) ont estimé que la pollinisation croisée entre des plants de coton situés dans des rangées adjacentes ne représentaient que 1 à 2 % des graines produites. Il peut aussi y avoir production de descendants fertiles, s'il y a pollinisation croisée entre *G. hirsutum* et *G. barbadense* (Brubaker *et al.*, 1999) – il existe donc en théorie un autre moyen facile par lequel les gènes de *G. hirsutum* pourraient se propager dans l'environnement. La culture de *G. barbadense* est toutefois relativement rare en Afrique orientale et occidentale.

Le flux de gènes, de l'espèce cultivée *G. hirsutum* aux populations férales de *G. hirsutum*, est possible et donnerait lieu à la production de graines viables. On peut toutefois réduire ce risque en assurant une distance géographique entre les espèces sauvages de coton et les plantations de coton. S'il y a établissement de resemis de coton dans des zones adjacentes à des populations férales existantes – comme cela peut se produire le long de certaines routes de transport – le risque de propagation de transgènes à ces populations férales peut augmenter. Au Burkina Faso, toutefois, l'hybridation entre la variété cultivée *Gossypium hirsutum* et les populations férales est improbable, car aucune population férale n'a pas été observée.

8.A-7 Répartition des espèces apparentées, incluant tout signe d'invasion

La culture du coton se pratique depuis des siècles dans le monde entier et, jamais, il n'a été fait mention de grave problème d'invasion. De plus, les nouveaux cultivars de coton ne présentent aucun des caractères normalement associés aux mauvaises herbes qui posent problème, comme la dormance des semences, la persistance dans les banques de semences du sol, la germination dans des conditions environnementales défavorables, une croissance végétative rapide, un court cycle de vie, un rendement grainier très élevé, ainsi qu'un taux élevé de dissémination des semences et leur propagation sur de grandes distances (Keeler, 1985; Keeler, 1989).

G. hirsutum et *G. barbadense* peuvent se développer sous forme de populations échappées de culture ou de faibles populations d'espèces exotiques naturalisées (Lazarides *et al.*, 1997; Sindel, 1997). L'établissement de telles populations n'est toutefois pas considéré comme une menace à la productivité agricole ou à la biodiversité indigène.

Il existe en Afrique treize espèces indigènes connues de *Gossypium* (Tableau 5). Aucun recensement exhaustif des espèces *Gossypium* présentes en Afrique orientale n'a été publié jusqu'à maintenant, mais Vollesen (1987) a publié un relevé des espèces africaines dans l'herbier de Kew. À partir de ces travaux, il a été établi que trois espèces sont présentes en Afrique orientale; il s'agit de *G. longicalyx*, *G. benadirensis* et *G. somalense*, toutes trois diploïdes. *Gossypium longicalyx* est une espèce distincte sur le plan cytogénétique, car elle est le seul membre du génome F (Percival *et al.*, 1999). *G. benadirensis* et *G. somalense* appartiennent au génome E.

L'hybridation entre des membres de génomes distincts, parmi les espèces de *Gossypium*, exige une intervention humaine et donne lieu à des descendants fonctionnellement stériles (Percival *et al.*, 1999). De plus, deux types d'obstacles potentiels doivent être surmontés pour que le flux génétique réussisse. Il y a ainsi les obstacles pré-zygotiques, qui incluent la séparation géographique, les différences dans la phénologie des fleurs, ainsi que les différents vecteurs de pollen et systèmes de croisement (p. ex., incompatibilité stigmatique ou stylaire) et les obstacles post-zygotiques, comme l'incompatibilité génétique à la méiose, l'avortement sélectif, l'absence d'adaptabilité des hybrides et des descendants stériles ou non adaptés obtenus par rétrocroisement (Brown *et al.*, 1997). Par ailleurs, même si des pollinisateurs communs sont présents, que les fleurs s'ouvrent simultanément, que la réceptivité est coordonnée et que les peuplements sont situés à proximité, l'incompatibilité chromosomique entre les espèces diploïdes et allotétraploïdes empêche l'hybridation interspécifique naturelle entre les espèces africaines sauvages et cultivées de coton.

Tableau 5 Répartition connue des espèces de *Gossypium* en Afrique (Vollesen, 1987; Percival *et al.*, 1999)

Genome	Species	Known Range
A	<i>G. herbaceum</i>	Mozambique, Zimbabwe, Botswana, Angola, Namibia, Swaziland, Transvaal province and Natal (South Africa)
B	<i>G. anomalum</i>	Angola, Namibia (poss. Niger, Chad, Sudan)
B	<i>G. triphyllum</i>	Angola, Botswana, Namibia
B	<i>G. capitatis-viridis</i>	An island endemic, Cap Verde Islands
F	<i>G. longicalyx</i>	Sudan, Uganda, Tanzania
E	<i>G. benadirensis</i>	Ethiopia, Somalia, Kenya
E	<i>G. bricchettii</i>	Somalia
E	<i>G. vollesenii</i>	Somalia
E	<i>G. stocksii</i>	Somalia, Oman
E	<i>G. somalense</i>	Niger, Chad, Sudan, Ethiopia, Somalia, Uganda, Kenya (sparse distribution)
E	<i>G. areysianum</i>	South Yemen
E	<i>G. incanum</i>	South Yemen
?	<i>G. trifurcatum</i>	Somalia

D'autres membres de la tribu des Gossypieae présents en Afrique incluent les genres *Cienfuegosia*, *Thespesia* et *Gossypiodes*; les genres *Cienfuegosia* et *Thespesia* sont présents uniquement en Afrique tropicale, tandis que *Gossypiodes* (*G. kirkii*) se trouve en Afrique orientale et à Madagascar (Wendell et Cronn, 2003). *Cienfuegosia* et *Thespesia* sont des espèces diploïdes (respectivement $2n = 20$ et $2n = 26$) et ne sont probablement pas compatibles, sur le plan chromosomique, avec le coton cultivé. Le genre *Gossypiodes* est considéré comme celui étant le plus étroitement apparenté à *Gossypium*, ayant divergé de la branche *Gossypium* durant le Pléistocène; cependant, il s'agit là aussi d'un genre diploïde (Wendell et Cronn, 2003).

Le transfert de gènes à des espèces végétales non apparentées est hautement improbable, en raison d'incompatibilités génétiques pré et post-zygotiques bien documentées pour les groupes végétaux vaguement apparentés. Enfin, aucune preuve de transfert horizontal de gènes, du coton vers d'autres organismes ou microorganismes, n'a été relevée.

8.A-8 Ravageurs et maladies courants du coton

Parmi les 30 organismes nuisibles du coton cultivé *G. hirsutum*, les plus importants sont les chenilles de *Helicoverpa armigera* et *Helicoverpa punctigera* et le tétranyque à deux points *Tetranychus urticae* (Shaw, 2000; Pyke et Brown, 2000).

Le ver de la capsule du coton (*H. armigera*) est une noctuelle présente dans l'ensemble de la région de l'Australasie-Pacifique, ainsi qu'en Afrique et en Europe de l'Ouest. Ce phytoravageur a un large spectre d'hôtes et ses chenilles s'attaquent à de nombreuses cultures agricoles et horticoles. Au cours des trente dernières années, la lutte contre ce ravageur s'est faite essentiellement par l'utilisation de pesticides de synthèse, ce qui a favorisé le développement d'une résistance étendue à un grand nombre de ces produits chimiques. À titre d'exemple, entre 80 et 90 % des insectes sont aujourd'hui résistants aux pyréthroïdes de synthèse. Dans le coton, les papillons nocturnes adultes pondent leurs œufs sur de jeunes branches terminales; en deux à trois jours, les œufs éclosent et les larves (chenilles) apparaissent. Les chenilles attaquent les jeunes feuilles et les bourgeons floraux et peuvent se creuser un chemin à l'intérieur des fruits en développement et consommer les graines et les fibres qui se développent. Le stade de chenille dure de 15 à 20 jours et *H. armigera* peut produire de quatre à cinq générations durant la saison de croissance du coton. Durant l'hiver, la dernière génération entre dans une phase d'arrêt de

la croissance, ou diapause, s'enfouissant dans le sol autour de la base des plantes. Les pupes hivernantes émergent du sol au printemps suivant. La culture motorisée du sol, à la fin de la saison de croissance du coton, brise les tunnels de sortie qui sont pratiqués par les larves en s'enfouissant dans le sol. Cette pratique culturale peut détruire plus de 90 % des pupes dans le sol et constitue un moyen efficace de réduire le nombre de papillons nocturnes qui émergeront au printemps et retarder ainsi l'apparition d'insectes résistants aux insecticides utilisés pour le coton.

Au Burkina Faso, *H. armigera* se développe dans deux types d'agrosystèmes asynchrones (Nibouche, 1994). Durant la saison des pluies, qui va de la mi-juin à octobre, le ravageur colonise les cultures pluviales (principalement le coton et le maïs) et les mauvaises herbes puis, durant la saison sèche (d'octobre à la mi-avril), *H. armigera* s'attaque aux cultures irriguées. Entre la mi-avril et la mi-juin, les cultures irriguées sont récoltées et aucune population de *H. armigera* n'est observée. Des études biologiques ont révélé que la diapause se produit au Burkina Faso, mais en très faibles proportions (Nibouche, 1994). Des migrations saisonnières peuvent se produire entre les cultures pluviales et les cultures irriguées au Burkina Faso ou, sur une plus grande échelle, entre la zone climatique soudanaise (Burkina Faso) et la zone climatique guinéenne (Côte d'Ivoire). De telles migrations après les mouvements saisonniers de la zone de convergence intertropicale ont été documentés chez *Heteroptera* du genre *Dysdercus* (Duviard, 1981) et chez *Agrius convolvuli* L. (lépidoptère de la famille des Sphingidae) (Bowden, 1973).

L'aleurode du tabac (*Bemisia tabaci*) est un important ravageur des plantes à fibres et des cultures horticoles et ornementales à travers le monde. Il peut causer d'importants dommages par l'alimentation directe, la production de miellat ou comme vecteur viral.

Les maladies du coton peuvent altérer la qualité des fibres et des graines, ainsi que le rendement de la culture et ses coûts de production (Bell, 1999). Les principales maladies du coton incluent les maladies des semis, les flétrissures fongiques (flétrissure fusarienne ou flétrissure verticillienne) et les taches des feuilles.

La flétrissure verticillienne et la flétrissure fusarienne sont des maladies fongiques causées respectivement par *Verticillium dahliae* et *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. Les champignons infectent l'apex des racines de la plante, puis pénètrent dans les vaisseaux du xylème où ils prolifèrent, causant l'obstruction des vaisseaux et l'apparition des symptômes de la flétrissure. La flétrissure verticillienne est répandue dans la plupart des régions de culture du coton et s'attaque à un vaste spectre d'hôtes, dont un grand nombre de mauvaises herbes courantes. En Tanzanie, on observe une hausse sensible de l'incidence de la flétrissure fusarienne depuis 1969 (hausse moyenne de 8 %) et la flétrissure verticillienne y est aussi présente (ICAC, 2003).

Les maladies des semis peuvent être causées par plusieurs champignons, les plus répandus étant *Pythium* et *Rhizoctonia*. Ces maladies peuvent provoquer la pourriture des graines et la fonte des semis et sont plus susceptibles de se produire lorsque la plantation est suivie de temps frais et humide.

Les taches des feuilles peuvent être causées par des champignons (tache alternarienne due à *Alternaria macrosporia* ou *A. alternata*) ou des bactéries (brûlure bactérienne causée

par *Xanthomonas campestris*). La tache alternarienne a été observée en Tanzanie et en Ouganda (ICAC, 2003), deux pays où l'on a aussi rapporté le mildiou (ICAC, 2003).

Les nématodes, en particulier ceux appartenant aux espèces *Meloidogyne* et *Pratylenchus*, sont d'autres ravageurs du coton en Afrique orientale (ICAC, 2003). En Tanzanie, *M. incognita*, *Pratylenchus* spp., *Rotylenchulus* spp., *Xiphinema* spp., *Aphelenchus* spp. et *Tylenchus* spp. ont été recensés (ICAC, 2003), alors que *M. incognita*, *M. acronea*, *Pratylenchus* spp. et *Rotylenchulus* spp sont présents en Ouganda.

8.A-9 Interactions possibles avec les autres organismes

Dans son milieu de culture, le coton subit des interactions constantes avec de nombreuses espèces. Plus de 1 326 espèces d'insectes ont été recensées dans les champs de culture commerciale du coton du monde entier, mais une faible proportion seulement sont des organismes nuisibles (Matthews et Tunstall, 1994).

8.B ORGANISME(S) DONNEUR(S)

Il faut des renseignements sur l'histoire naturelle de l'organisme donneur de tout produit génique exprimé, en particulier si le donneur ou d'autres membres de son genre présentent normalement des caractères de pathogénicité ou de toxicité environnementale ou d'autres caractères (p. ex., source d'allergènes importants) qui ont une incidence sur la santé humaine.

8.B-1 Identification des organismes donneurs

Bacillus thuringiensis:

La lignée MON 15985 contient des versions modifiées des gènes *cry1Ac* et *cry2Ab*, tous deux dérivés de souches de *B. thuringiensis*. Les gènes natifs *cry1Ac* et *cry2Ab* ont été recréés synthétiquement pour en optimiser l'expression dans les végétaux.

Escherichia coli:

La lignée MON 15985 exprime également les gènes *nptII* et *uidA*, dérivés d'*E. coli*. Le gène *nptII*, issu de l'élément transposable Tn5, code pour l'enzyme néomycine phosphotransférase II et il a été utilisé comme marqueur de sélection durant la création de la lignée MON 531 – lignée parentale ayant servi durant la transformation végétale pour la création de la lignée MON 15985. Le gène *uidA* (ou *gus*), qui a été isolé de la souche K12 d'*E. coli*, code pour l'enzyme β -D-glucuronidase (GUS); il a été inclus comme marqueur interprétable pour l'identification colorimétrique des transformants de la lignée 15985 après une coloration histochimique.

8.B-2 Innocuité des organismes donneurs

Bacillus thuringiensis:

Bacillus thuringiensis est une bactérie cristallifère sporulée Gram positif, qui est utilisée sur une base commerciale depuis plus de 40 ans pour lutter contre des insectes nuisibles. Ce microorganisme est présent à l'état naturel dans le sol, dans le monde entier. Certaines souches de *B. thuringiensis* éliminent les insectes nuisibles en produisant des protéines insecticides cristallines, dites delta-endotoxines, chacune ayant un spectre d'activité précis contre les insectes ciblés (Tableau 6). Pour être efficace contre l'insecte nuisible, la

protéine doit être ingérée. Dans l'intestin moyen de l'insecte, la protéine se fixe à des récepteurs spécifiques, puis elle s'introduit dans la membrane et forme des pores spécifiques aux ions. Ces phénomènes perturbent le processus digestif et provoquent la mort de l'insecte. Il n'existe toutefois aucun récepteur des delta-endotoxines des sous-espèces de *B. thuringiensis* à la surface des cellules intestinales des mammifères; les humains ne sont donc pas sensibles à l'action de ces protéines, ce qui a été confirmé par de nombreuses études de sécurité réalisées sur des animaux de laboratoire, substitués expérimentaux des humains. Les résultats de certaines de ces études ont été publiés dans des revues scientifiques (Ignoffo, 1973; Shaddock *et al.*, 1983; Siegel et Shaddock, 1989) et les résultats des études de sécurité non publiées, produites par les détenteurs d'homologation de préparations commerciales de *B. thuringiensis*, ont été résumés dans la norme d'homologation *Registration Standard for Bt Formulations* de l'EPA (EPA, 1988).

Ces données scientifiques témoignent d'antécédents d'utilisation sans risque des préparations du *B. thuringiensis*. Sur la base des données scientifiques disponibles, l'EPA et d'autres scientifiques responsables de la réglementation dans le monde entier ont établi que l'utilisation de produits homologués issus de *B. thuringiensis* ne présente pas de risques importants pour la santé humaine ou les organismes non visés.

Tableau 6 δ-endotoxines de Bt et leur spectre d'activité contre des insectes nuisibles particuliers

Cry protein	Origin (Bt subspecies)	Major target insects	
		Order ²	Common names
Cry1Aa	<i>kurstaki</i>	L	silk worm, tobacco horn worm, European corn borer
Cry1Ab	<i>berlineri</i>	L,D	tobacco horn worm, cabbage worm, mosquito
Cry1Ac	<i>kurstaki</i>	L	tobacco budworm, cabbage looper, cotton bollworm
Cry1Ad1	<i>aizawai</i>	L	several Lepidoptera
Cry1Ae1	<i>alesti</i>	L	tobacco budworm
Cry1Ba1	<i>thuringiensis</i>	L	cabbage worm
Cry1Bc2	<i>morrisoni</i>	L,D	several Lepidoptera
Cry1Ca3	<i>entomocidus</i>	L	cotton leaf worm, mosquito
Cry1Cb1	<i>galleriae</i>	L	beet army worm
Cry1Da1	<i>aizawai</i>	L	beet army worm, tobacco horn worm
Cry1E	<i>kenyae</i>	L	cotton leaf worm
Cry1Eb1	<i>aizawai</i>	L	several Lepidoptera
Cry1Fa	<i>aizawai</i>	L	European corn borer, beet army worm
Cry2Aa	<i>kurstaki</i>	L,D	gypsy moth, mosquito
Cry2Ab	<i>kurstaki</i>	L	gypsy moth, cabbage looper, tobacco horn worm
Cry2Ac	<i>shanghai</i>	L	tobacco horn worm, gypsy moth
Cry3Aa	<i>san diego</i>	C	Colorado potato beetle
Cry3Aa3	<i>tenebrionis</i>	C	Colorado potato beetle
Cry3Ba	<i>tolworthi</i>	C	Colorado potato beetle
Cry7Aa	N/A ³	C	spotted cucumber beetle
Cry4Aa	<i>israelensis</i>	D	mosquito (<i>Aedes</i> and <i>Culex</i>)
Cry4Ba	<i>israelensis</i>	D	mosquito (<i>Aedes</i>)
Cry9Aa	<i>galleriae</i>	L	greater wax moth
Cry9Ba	<i>galleriae</i>	L	greater wax moth

1. Adapted from Krattiger (1997).

2. L: Lepidoptera; C: Coleoptera; D: Diptera

3. N/A: Not available.

***Escherichia coli*:**

Des souches d'*Escherichia coli* sont utilisées depuis 60 ans pour étudier la physiologie et la génétique des insectes. La souche sauvage K12 a été utilisée durant les premières

études sur la conjugaison et la recombinaison (Swartz, 1996) et elle continue d'être largement utilisée et étudiée, en raison notamment de son utilisation dans les études sur la recombinaison ainsi que de la production et de la cartographie par conjugaison d'un grand nombre de mutants dans les voies métaboliques, qui ont facilité l'étude de la génétique et de la physiologie des bactéries. Dans une étude sur des souches d'*E. coli* incluant des représentants de la souche K12, l'amplification par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a établi l'absence des gènes de virulence présents dans les isolats pathogènes connus de ce genre (Kuhnert *et al.*, 1997). Les auteurs ont conclu que les souches K12 couramment utilisées en laboratoire sont dépourvues de facteurs de virulence et devraient être considérées non pathogènes. De même, une étude plus directe du potentiel pathogène des souches K12, réalisée sur la souris BALB/c et le modèle d'intestin de poussin, conclut que les souches K12 ne possèdent pas de mécanismes pathogènes connus et devraient être considérées non pathogènes (Chart *et al.*, 2000). Sur la base de ces études, et compte tenu du fait que la souche K12 d'*E. coli* est largement utilisée pour la recherche et par de nombreux laboratoires depuis des décennies sans avoir causé de dommages, on considère que la souche K12 d'*E. coli* est généralement inoffensive.

8.C LE MILIEU RÉCEPTEUR

Les renseignements sur le milieu récepteur sont d'une importance capitale pour évaluer les incidences possibles de l'introduction (culture) d'une plante transgénique dans l'environnement. Ces éléments d'information permettent en effet d'établir un cadre de référence pour l'évaluation des impacts environnementaux. Aux fins de la présente étude de cas, les renseignements sur le milieu récepteur font référence à la culture du coton en Afrique occidentale.

8.C-1 Présence d'espèces sexuellement compatibles, incluant des populations férales

À l'exception des variétés cultivées de coton, aucune pollinisation croisée ne se produira avec des espèces apparentées, car il n'existe aucune variété de coton sexuellement compatible à l'état sauvage, ni aucune espèce sauvage apparentée pouvant facilement se croiser avec le coton, dans les régions où cette culture est pratiquée en Afrique occidentale. La culture de *Gossypium hirsutum* dans cette région du monde se pratique depuis le XIX^e siècle; l'Afrique occidentale n'est toutefois pas le centre d'origine de cette espèce particulière, bien qu'on y trouve une espèce étroitement apparentée (*Gossypium herbaceum* var. *africana*). Cette dernière espèce est diploïde alors que *G. hirsutum* est allotétraploïde – il ne peut donc pas y avoir de pollinisation croisée (et même si un tel croisement se produisait dans la nature, les semences qui en résulteraient seraient stériles). Les croisements naturels ne sont considérés possibles qu'entre espèces tétraploïdes.

Le potentiel d'hybridation entre les espèces cultivées de coton (*Gossypium hirsutum*) et les espèces sauvages de *G. hirsutum* est également peu probable, car aucune variété férale n'a été observée au Burkina Faso.

8.C-2 Pratiques agronomiques

La production de coton en Afrique occidentale requiert relativement peu d'intrants; le coton est récolté à la main et il est de haute qualité. Les dommages causés par les larves

de lépidoptères peuvent réduire les récoltes dans une proportion pouvant atteindre 90 % (Sere, 2007). Au Burkina Faso, *H. armigera* se développe dans deux types d'agroécosystèmes asynchrones (Nibouche, 1994). Durant la saison des pluies, qui va de la mi-juin à octobre, les larves colonisent les cultures pluviales (principalement le coton et le maïs) et les mauvaises herbes. Tout au long de la saison sèche (d'octobre à la mi-avril), *H. armigera* s'attaque aux cultures irriguées. De la mi-avril à la mi-juin, le taux de diapause est très faible au Burkina Faso. Des migrations saisonnières peuvent se produire entre les cultures pluviales et irriguées à l'intérieur du Burkina Faso ou, sur une plus grande échelle, entre les zones climatiques soudanaise (Burkina Faso) et guinéenne (Côte d'Ivoire). De telles migrations ont été documentées chez d'autres espèces d'insectes, mais non chez *H. armigera* (Bowden, 1973).

Lorsqu'ils y ont accès, les agriculteurs du Burkina Faso font habituellement l'épandage d'insecticides six fois par saison, pour lutter contre les insectes suceurs et mangeurs. Ce traitement coûte environ 69 \$ (US) l'hectare (Sere, 2007).

En Afrique occidentale, de un à deux millions de ménages cultivent le coton, et la presque totalité de cette culture est pratiquée sur des exploitations agricoles relativement petites (trois à dix hectares). La culture de coton s'inscrit habituellement dans un système de production diversifiée qui inclut la production de céréales et de légumes et d'autres activités visant à répondre aux besoins alimentaires et financiers des agriculteurs. Ces exploitations agricoles dépendent en grande partie de la main-d'œuvre familiale et les agriculteurs modifient leurs types de production au fil des ans, pour gérer les risques et s'adapter à l'évolution des contraintes (p. ex., climat, qualité du sol, etc.), aux nouvelles possibilités (nouveaux marchés urbains, possibilités de transformation et de commercialisation, etc.) et aux conséquences imprévues. Ces exploitations agricoles familiales produisent la presque totalité des denrées de consommation courante, des oléagineux et des cultures commerciales de la région, mais elles sont aussi d'importants consommateurs de fruits, de légumes et d'aliments transformés variés importés (Hussein *et al.*, 2005).

Au Bénin, au Burkina Faso, au Tchad et au Mali, les agriculteurs produisent généralement du coton Upland (*G. hirsutum*), une culture pluviale. Le rendement moyen, qui est d'environ une tonne de coton-graine et 430 kg de fibre par hectare, ne représente que 45 % environ du rendement américain moyen. Des données récentes indiquent que les rendements stagnent, voire régressent, dans la région, et un certain nombre d'initiatives ont été mises en œuvre pour renverser cette tendance (Bingen et Busch, 2006). Ces initiatives visent à améliorer la fertilité et la gestion des sols, à favoriser la rotation avec des légumineuses, à développer des pratiques appropriées d'utilisation et de gestion de l'eau et des engrais, ainsi qu'à instaurer des systèmes de lutte intégrée durable.

9. CARACTÉRISATION DU PRODUIT

9.A CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE

Une description détaillée des caractéristiques moléculaires de la plante modifiée est nécessaire pour montrer que le promoteur du projet a analysé de manière critique la

plante et ses différents produits, y compris tous les gènes et protéines nouveaux. La caractérisation d'une plante transgénique au niveau moléculaire permet de donner des éléments d'information sur : la composition et l'intégrité de l'ADN inséré, le nombre de copies de l'ADN inséré, le nombre de sites d'insertion et le niveau d'expression de la (des) protéine(s) nouvelle(s) dans le temps et dans les différents tissus. La connaissance des gènes introduits ou modifiés, de leur régulation et du site d'intégration dans le génome hôte peut apporter des éléments d'information sur les conséquences possibles, directes et indirectes, de la modification génétique.

Par exemple, le risque d'effets indésirables résultant d'une inactivation ou d'une activation par insertion peut être évalué en caractérisant l'ADN hôte adjacent et en évitant les produits contenant les transgènes à proximité immédiate des gènes connus pour affecter la production de composés potentiellement toxiques ou allergènes. Par ailleurs, la caractérisation moléculaire des plantes transgéniques fait souvent l'objet d'une attention démesurée de la part des organismes en charge de la réglementation en ce qui concerne les renseignements communiqués en termes d'alimentation et de sécurité alimentaire ou environnementale. Cette situation peut en partie s'expliquer par le fait que les données générées par les analyses moléculaires sont normalement moins sujettes à interprétation que celles soumises pour répondre à des questions, par exemple sur l'impact d'une plante transgénique sur la biodiversité.

Bien que les organismes de réglementation exigent généralement des éléments d'information sur l'intégrité et le nombre de copies de l'ADN inséré, rien n'indique que les plantes transgéniques contenant plusieurs copies d'ADN inséré soient moins « sûres » que des plantes comparables ne contenant qu'une seule copie. Une lignée de canola (*Brassica napus*; événement de transformation 23-198, 23-18) mise au point en introduisant un gène codant la thioestérase du laurier de Californie (*Umbellularia californica*) afin d'augmenter les concentrations d'acide laurique (12:0) et, dans une moindre mesure, de l'acide myristique (14:0), constitue un exemple d'événement de transformation approuvé contenant un grand nombre de copies de transgènes. 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.

Il est important d'insister sur le fait que bien que nécessaire, la caractérisation moléculaire de l'ADN introduit (ou modifié) ne suffit pas pour prédire des conséquences possibles non prévues et ne remplace pas des mesures directes de l'expression des gènes ou des modifications des concentrations de nutriments et de facteurs antinutritionnels, de toxiques endogènes ou d'allergènes potentiels.

En raison de leur mode de production, les plantes transgéniques sont plus sensibles à une caractérisation génétique moléculaire d'envergure que les plantes comparables produites selon d'autres méthodes de sélection. À cet égard, il est important de faire la distinction entre "indispensable à savoir" et "bon à connaître". dans le domaine de l'évaluation de la sécurité. Cette question est d'une pertinence toute particulière au Canada, où la réglementation des aliments nouveaux et des végétaux à caractères nouveaux englobe les produits dérivés obtenus selon des méthodes de sélection pour lesquelles il n'est pas possible de fournir des données moléculaires détaillées. Dans ces derniers exemples, il est difficile d'affirmer que l'évaluation de la sécurité a été affectée par des renseignements

incomplets sur la séquence d'ADN. En résumé, pour appliquer une approche "basée sur le produit" pour établir la réglementation et évaluer les risques, il faut avoir un niveau de garantie de la sécurité comparable à celui des produits soumis à une réglementation semblable parce qu'ils présentent des risques équivalents.

La lignée MON 15985 a été créée par transformation biolistique de méristèmes du coton avec de l'ADN purifié contenant les cassettes d'expression des gènes *cry2Ab* et *uidA* (GUS). La variété parentale (DP50B) utilisée pour la transformation a été obtenue d'un croisement classique entre DP50 et la lignée de coton transgénique Bollgard® MON 531. Comme la lignée MON 15985 est le produit de deux transformations indépendantes, les sections qui suivent décrivent séparément la méthode de transformation et l'ADN qui a pu être introduit durant la production des lignées MON 531 (section 9.A-2) et MON 15985 (section 9.A-3).

9.A-1 Méthodes courantes de transformation végétale

Les deux principales méthodes pour l'introduction de nouveau matériel génétique dans des cellules végétales sont la transformation par *Agrobacterium* et le bombardement au moyen de microprojectiles. La lignée parentale MON 531 a été obtenue par transformation par *Agrobacterium*, alors que la lignée MON 15985 est issue du bombardement au moyen de microprojectiles de la lignée MON 531. Aucune de ces méthodes ne soulève de problèmes de sécurité particuliers, mais chacune donne habituellement lieu à des profils d'intégration de l'ADN différents. Une brève discussion de chacune de ces méthodes de transformation suit.

Transformation par *Agrobacterium*:

Agrobacterium tumefaciens est un agent phytopathogène du sol qui utilise des processus de recombinaison génétique pour déstabiliser 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 (Tempe et Schell, 1977). Il stimule aussi la prolifération des cellules parasitées et la tumeur de la galle du collet qui en découle est un résultat direct de l'incorporation d'une région de l'ADN de transfert (ADN-T) provenant d'un plasmide circulaire de grande taille (150-250 kB) appelé plasmide Ti, 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 pouvant être transférées dans les cellules végétales qui a conduit à la construction du premier vecteur et des premiers systèmes de souches bactériennes destinés à la transformation des végétaux (pour plus de précisions, se référer à : Hooykaas et Shilperoort, 1992). Depuis le premier enregistrement de gènes étrangers codant un plant de tabac transgénique (Fraley *et al.*, 1983), 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 et les méthodes utilisées par *Agrobacterium* pour transférer des gènes dans les monocotylédones vient seulement d'être mis 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 (Enríquez-Obregón, 1997, 1998; Arencibia *et al.*, 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 minimaux et une plus grande efficacité de la transformation que les techniques de libération directe d'ADN telles que le bombardement au moyen de microparticules (Pawlowski et Somers, 1996; Gelvin, 1998).

Jusqu'en 1995, on considérait en général que 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 montré 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. Matzke et Matzke (1998) indiquent que les séquences du squelette qui relie l'ADN-T et l'ADN de l'hôte semblent être particulièrement délétères pour l'expression génique, une observation appuyée par les conclusions des auteurs qui ont constaté que les fragments du squelette isolés de l'ADN-T s'accompagnaient de transgènes d'expression stable.

Les végétaux transformés 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-T 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'ADN-T peut 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 (Gelvin, 1998).

L'expression variable des transgènes ou la mise sous silence des gènes est un phénomène ubiquiste chez les plantes transgéniques, qu'elles soient produites par assimilation directe de l'ADN ou par transformation par *Agrobacterium*. 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.

Bombardement au moyen de microprojectiles:

Le bombardement au moyen de microprojectiles (aussi connu sous le nom de bombardement au moyen de microparticules ou transformation biolistique) est une technique utilisée pour libérer l'ADN directement dans le génome hôte qui s'est révélée utile pour la transformation de tissus végétaux récalcitrants à l'infection par *Agrobacterium*. En résumé, un plasmide ou de l'ADN linéarisé contenant le(s) gène(s) concerné(s) est fixé à des particules de tungstène ou d'or (billes micro-porteuses) qui sont libérées dans les cellules de l'hôte à haute vitesse de manière à pénétrer le noyau des cellules végétales. Dans le noyau, 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, néanmoins, il est relativement inefficace comparé à *Agrobacterium* pour la production de cellules végétales à transformation stable.

La transformation biolistique du tissu végétal donne des modèles d'intégration du transgène qui mettent généralement 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. Le nombre de copies de transgènes peut varier de 1 à 20. Les copies multiples se séparent normalement les unes des autres sous forme de locus de transgènes, indiquant ainsi que les séquences sont intégrées dans des locus étroitement reliés ou dans un locus unique.

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. 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). 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 (Folger *et al.*, 1982). Des fragments plus petits que les fragments pleine longueur sont la preuve de phénomènes de délétions et de troncatures.

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 coségrégation 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).

9.A-2 Méthode de transformation de la lignée MON 531

La lignée de coton MON 531 est issue de la transformation par *Agrobacterium* du coton (*Gossypium hirsutum*) lignée cv Coker C312 avec le plasmide PV-GHBK04 (Figure 1). Le plasmide PV-GHBK04 contenait les éléments suivants : fragment oriV de 0,4 kb du plasmide RK2 scindé à un segment de 3,4 kb de pBR322, pour en permettre le maintien dans *Escherichia coli* et *Agrobacterium tumefaciens*. Ces éléments ont été fusionnés à un fragment d'ADN de 360 bp provenant du plasmide pTiT37 qui contenait l'extrémité droite de l'ADN-T de type nopaline.

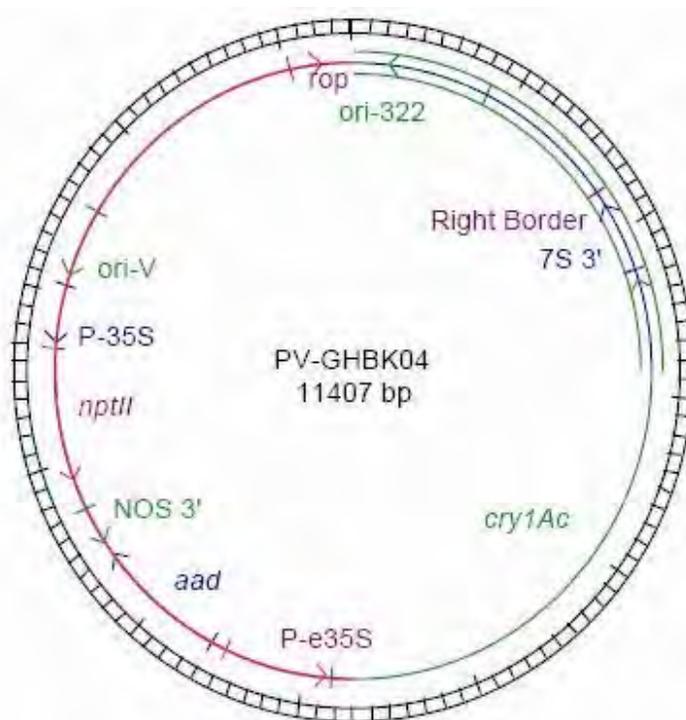


Figure 1 Carte du plasmide PV-GHBK04.

Le reste était composé de deux gènes mis au point pour l'expression végétale, soit le gène *cry1Ac* et le gène *nptII* (*neo*) codant pour NPTII. Le gène *cry1Ac* a été modifié pour favoriser une expression optimale dans les végétaux : il contenait une partie de l'extrémité 5' du gène *cry1Ab* et une portion du gène *cry1Ac*. L'expression du gène *cry1Ac* modifié a été contrôlée par le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), avec une région activante dupliquée et la région non traduite de la sous-unité alpha du gène de la bêta-conglycine (soja), qui donne le signal de la polyadénylation de l'ARN messager (séquence de terminaison 7S 3').

Le plasmide de transformation contenait également le gène *aad* isolé du transposon bactérien Tn7 d'*E. coli* codant pour l'enzyme aminoside adényltransférase (AAD) qui confère la résistance aux antibiotiques spectinomycine et streptomycine. Le gène *aad* était contrôlé par son propre promoteur et terminateur bactériens et a été inclus dans le gène chimère comme marqueur, pour permettre la sélection des bactéries contenant le plasmide PV-GHBK04 avant la transformation des cellules végétales. Le gène *aad* n'a aucune séquence de régulation de végétaux et n'a pas été exprimé dans les tissus végétaux.

Le gène *nptII* a été localisé en aval du gène *aad* et son expression a été régulée par le promoteur 35S du virus CaMV et la région 3' non traduite du gène de la nopaline synthase (*nos*) du plasmide pTiT37 de la souche T37 d'*A. tumefaciens*.

Le Tableau 7 présente un résumé des éléments génétiques contenus dans le vecteur plasmidique PV-GHBK04.

Tableau 7 Résumé des éléments génétiques contenus dans le plasmide PV-GHBK04

Genetic Element	Size (kb)	Function
right border (RB)	0.09	A DNA fragment from the pTiT37 plasmid containing the 24 bp border nopaline-type T-DNA right border used to initiate the T-DNA transfer (RB) from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> to the plant genome (Depicker <i>et al.</i> , 1982, and Bevan <i>et al.</i> , 1983).
P-E35S	0.62	The cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter (Odell <i>et al.</i> , 1985) with the duplicated enhancer region (Kay <i>et al.</i> , 1987).
cry1A(c)	3.5	The gene which confers insect resistance. The modified gene encodes an amino acid sequence that is 99.4% identical to the <i>cry1A(c)</i> gene as described by Adang <i>et al.</i> (1985).
7S 3'	0.43	A 3' non-translated region of the soybean alpha subunit of the beta-conglycinin gene that provides the mRNA polyadenylation signals (Schuler <i>et al.</i> , 1982).
<i>aad</i>	0.79	The gene for the enzyme 3''(9)-O-aminoglycoside adenylyltransferase that allows for bacterial selection on spectinomycin or streptomycin (Fling <i>et al.</i> , 1985).
P-35S	0.32	The 35S promoter region of the cauliflower mosaic virus (CaMV) (Gardner <i>et al.</i> , 1981; Sanders <i>et al.</i> , 1987).
<i>nptII</i>	0.79	The gene isolated from Tn5 (Beck <i>et al.</i> , 1982) which encodes for neomycin phosphotransferase type II. Expression of this gene in plant cells confers resistance to kanamycin and serves as a selectable marker for transformation (Fraley <i>et al.</i> , 1983).
NOS 3'	0.26	A 3' non-translated region of the nopaline synthase gene which functions to terminate transcription and direct polyadenylation of the <i>nptII</i> mRNA (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Bevan <i>et al.</i> , 1983).
<i>oriV</i>	0.62	Origin of replication for ABI <i>Agrobacterium</i> derived from the broad-host range plasmid RK2 (Stalker <i>et al.</i> , 1981).
<i>ori322/rop</i>	1.8	A segment of pBR322 which provides the origin of replication for maintenance of the PV-GHBK04 plasmid in <i>E. coli</i> , the replication of primer (<i>rop</i>) region and the <i>bom</i> site for the conjugational transfer into the <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cells (Bolivar <i>et al.</i> , 1977; Sutcliffe, 1978).

*Sizes given are the actual size of the genetic elements and do not include DNA border sequences, necessary for cloning purposes, unless otherwise indicated.

9.A-3 Méthode de transformation de la lignée MON 15985

La lignée MON 15985 a été créée par transformation biolistique de méristèmes de coton avec de l'ADN purifié contenant les cassettes d'expression des gènes *cry2Ab* et *uidA* (GUS). La variété parentale utilisée pour la transformation (DP50B) est issue d'un croisement classique entre la lignée DP50 et la lignée de coton transgénique Bollgard® 531.

L'ADN utilisé pour la transformation consistait en un fragment d'environ 6 kb contenant les cassettes d'expression des gènes *cry2Ab* et *uidA*; il a été obtenu du plasmide PV-GHBK11 (Figure 2), après digestion par des enzymes de restriction en présence de *KpnI* et purification par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Le fragment d'ADN purifié ne contenait pas d'autres séquences dérivées du plasmide, comme l'origine bactérienne du site de réplication ou les gènes marqueurs de la résistance aux antibiotiques (Tableau 8). Le fragment linéaire purifié *ca.* de 6 kb a été précipité sur des particules d'or, avec du chlorure de calcium et de la spermidine, puis a été introduit dans la variété de coton DP50B, une variété commerciale de la s Delta and Pine Land Company issue de la lignée MON 531 (Bollgard®) et contenant le gène *cryIAC* et le gène marqueur *nptII*, en suivant essentiellement la méthode décrite par John (1997).

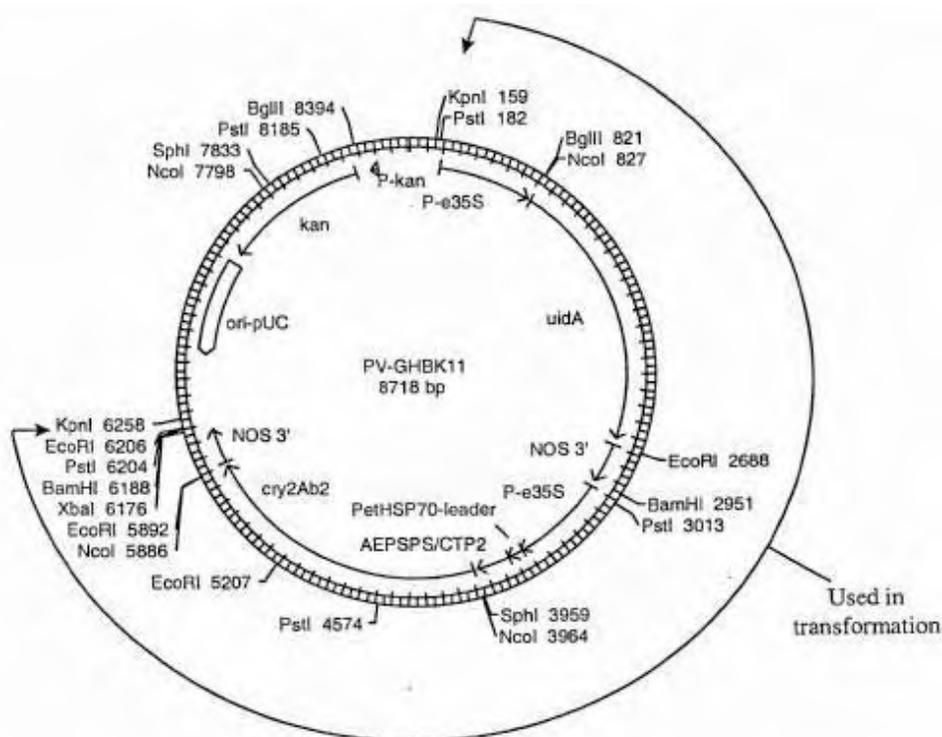


Figure 2 Carte du plasmide PV-GHBK11.

The region used for transformation, between the two *KpnI* sites and containing the *cry2Ab* and *uidA* gene cassettes, is illustrated. The remaining portion is the plasmid backbone.

Le gène chimère *cry2Ab* était constitué d'une copie synthétique du gène *cry2Ab* isolé à l'origine de *B. thuringiensis*, sous-espèce *kurstaki* (Btk), sous le contrôle régulateur du promoteur 35S doublement amélioré du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV 35S;

P-e35S) et un signal de polyadénylation isolé de la région 3' terminale non traduite du gène de la nopaline synthase (*nos*) provenant d'*Agrobacterium tumefaciens*. L'activation transcriptionnelle a été modulée par l'inclusion de la séquence de tête 5' terminale non traduite de la protéine de choc thermique 70 du pétunia (PetHSP70). Le ciblage de la protéine exprimée vers les chloroplastes a été réalisé en fusionnant la séquence codant pour le peptide de transit chloroplastique isolé du gène et codant pour la 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (EPSPS) d'*Arabidopsis thaliana*, à la séquence 5' terminale du gène *cry2Ab*.

Le gène *cry2Ab* (1 907 nucléotides) a été complètement synthétisé de nouveau pour incorporer les codons préférés de la plante, et la protéine exprimée était à 88 % identique (similarité de 97 % avec des substitutions conservatives) à la protéine native Cry2Ab exprimée dans *B. thuringiensis* (Figure 3). Un autre acide aminé (position 2, Figure 3) a été introduit pour créer un site de clivage de l'enzyme de restriction aux fins du clonage. On s'attend à ce que la protéine Cry2Ab2 présente dans les plantes de coton MON 15985 contienne trois autres acides aminés résultant du traitement du peptide de transit chloroplastique (positions soulignées 77-79, Figure 3).

Le gène *uidA* (synonyme *gus*), formé de 1 808 nucléotides, a été isolé de la souche K12 d'*E. coli*; ce gène code l'enzyme β -D-glucuronidase (GUS; Figure 4) et il a été inclus comme marqueur interprétable, pour permettre l'identification colorimétrique des tissus végétaux transformés après coloration histochimique. La β -D-glucuronidase est une exohydrolase qui catalyse l'hydrolyse d'une gamme de β -glucuroconjugués en leurs acides et aglycones correspondants (Oshima *et al.*, 1987). L'hydrolyse du substrat artificiel – *p*-nitrophényl- β -D-glucuronide – libère un colorant bleu qui sert de marqueur visible durant les processus de transformation végétale (Jefferson *et al.*, 1987). La biochimie et l'activité catalytique de cette protéine ont été largement étudiées (Wang et Touster, 1972). La protéine GUS est omniprésente dans la nature; on la trouve ainsi chez les vertébrés, y compris les humains (Jefferson *et al.*, 1986), les bactéries, les bovins et des espèces invertébrées (Gilissen *et al.*, 1998). Une activité similaire à celle de la protéine GUS a aussi été détectée dans divers tissus de plus de 50 espèces végétales, dont certaines servant à l'alimentation humaine, comme la pomme de terre, la pomme, les amandes, le seigle, la rhubarbe et la betterave à sucre (Schulz et Weissenbock, 1987; Hodal *et al.*, 1992; Wozniak et Owens, 1994). L'expression du gène *uidA* a été régulée par le même promoteur 35S du virus CaMV (P-e35S) et les mêmes séquences NOS 3' que ceux utilisés pour le gène chimère *cry2Ab*.

Tableau 8 Résumé des éléments génétiques sur le fragment de 6 kb de l'ADN transformant de PV-GHBK11

Genetic element	Size (kb)	Function
P-e35S (CaMV 35S)	0.6	The cauliflower mosaic virus (CAMV) 35S promoter with the duplicated enhancer region; used to drive expression of the <i>cry2Ab</i> and <i>uidA</i> genes.
PetHSP70-leader	0.1	An intron from the petunia heat shock protein <i>hsp70</i> gene; provides for an increased level of transcription.
AEPSPS/CTP2	0.23	An N-terminal chloroplast transit peptide from <i>Arabidopsis thaliana</i> EPSPS-coding gene.
<i>cry2Ab</i>	1.9	A synthetic <i>cry</i> gene based on a sequence from <i>Bacillus thuringiensis</i> .
NOS 3'	0.26	3' nontranslated region of the nopaline synthase which terminates transcription and directs polyadenylation.
<i>uidA</i>	1.8	β -D-glucuronidase (GUS) protein-encoding gene from the <i>E. coli</i> plasmid, pUC19.

```

1  MAQVSRICNG VQNPSLISNL SKSSQRKSPV SVSLKTQQHP RAYPISSSWG
51  LKKSGMTLIG SELRPLKVMS SVSTACMLAM DNSVLNSGRT TICDAYNVAA
101 HDPFSFQHKSLDTVQKEWTE WKKNNHSLYL DPIVGTVASF LLKKVGSVLG
151 KRILSELRNL IFPSGSTNLM QDILRETEKF LNQLNTDTL ARVNAELTGL
201 QANVEEFNRQ VDNFLNPNRN AVPLSITSSV NTMQQLFLNR LPQFQMGGYQ
251 LLLLPLFAQA ANLHLSFIRD VILNADEWGI SAATLRTRYRDLKKNYTRDYS
301 NYCINTYQSA FKGLNTRLHD MLEFRTYMFL NVFEYVSIWS LFKYQSLLVS
351 SGANLYASGS GPQQTQSFTS QDWPFLYSLF QVNSNYVLNG FSGARLSNTF
401 PNIVGLPGST TTHALLAARV NYSGGISSGD IGASPFNQNF NCSTFLPPLL
451 TPFVRSWLDS GSDREGVATV TNWQTESFET TLGLRSGAFT ARGNSNYFPD
501 YFIRNISGVP LVVRNEDLRR PLHYNEIRNI ASPSGTPGGA RAYMVSVHNR
551 KNNIHAVHEN GSMIHLAPND YTGFTISPIH ATQVNNQTRT FISEKFGNQG
601 DSLRFEQNNT TARYTLRGNG NSYNLYLRVS SIGNSTIRVT INGRVYTATN
651 VNTTNNNDGV NDNGARFSDI NIGNVVASSN SDVPLDINVT LNSGTQFDLM
701 NIMLVPTNIS PLY

```

Figure 3 Séquence protéique déduite de Cry2Ab2 dans la lignée de coton MON 15985.

The sequence deduced from the DNA used to transform cotton. The chloroplast transit peptide is shown in italics (residues 1-79). The Cry2Ab2 protein corresponds to residues 80-713. The underlined amino acids (residues 77-79) correspond to the predicted portion of the chloroplast transit peptide remaining after processing. The amino acid at position 81 (D, aspartic acid) corresponds to the residue introduced for cloning purposes.

1	MVRPVETPTR	EIKKLDGLWA	FSLDRENCGI	DQRWVESALQ	ESRAIAVPGS
51	FNDQFADADI	RNYAGNVWYQ	REVFIPKGWA	GQRIVLRFDA	VTHYGKVVVN
101	NQEVMEHQGG	YTFEADVTP	YVIAGKSVRI	TVCVNNELNW	QTI PPGMVIS
151	DENGKKKQSY	FHDFFNYAGI	HRSVMLYTTP	NTWVDDITVV	THVAQDCNHA
201	SVDWQVVANG	DVSVELRDAD	QQVVATGQGT	SGTLQVVNPH	LWQPGEGYLY
251	ELCVTAKSQT	ECDIYPLRVG	IRSVAVKGEQ	FLINHKKPFYF	TGFGRHEDAD
301	LRGKGFNDVL	MVHDHALMDW	IGANSYRTSH	YPYAEEMLDW	ADEHGIVVID
351	ETAAVGFNLS	LGIGFEAGNK	PKELYSEEAV	NGETQQAHLQ	AIKELIARDK
401	NHPSVVMWSI	ANEPDTRPQA	AREYFAPLAE	ATRKLDPTRP	ITCVNVMFCD
451	AHTDTISDLF	DVLCLNRYYG	WYVQSGDLET	AEKVLEKELL	AWQEKLHQPI
501	IITEYGVDTL	AGLHSMYTDI	WSEEQCAWL	DMYHRVFDRV	SAVVGEQVWN
551	FADFATSQGI	LAVGGNKKGI	FTRDRKPKSA	AFLLOKRWGT	MNFGEKPPQG
601	GKQ				

Figure 4 Séquence d'acides aminés déduite de la protéine GUS exprimée dans MON 15985.

9.A-4 Caractérisation de l'ADN introduit

Pour illustrer cette étude de cas, nous ne décrivons en détail que la caractérisation de l'ADN inséré, qui a été dérivé du fragment linéaire de 6 kb de l'ADN transformant (c.-à-d. du plasmide PV-GHBK11) en présence de *KpnI* et qui a été utilisé pour produire la lignée MON 15985. Comme nous l'avons indiqué précédemment, la plante hôte contenait déjà un insert transgénique dont l'utilisation commerciale dans la lignée de coton MON 531 a été approuvée. Une analyse moléculaire antérieure de la lignée MON 531 a révélé que les deux copies de l'insert de l'ADN-T sont disposés selon un arrangement tête-bêche. Un de ces inserts contient le gène *cryIAc* pleine longueur et le gène codant pour la NPTII et le deuxième insert contient une portion 3' inactive du gène *cryIAc*. Les deux inserts ont été liés et ségrégués sous forme de locus unique. Des analyses similaires ont démontré que les séquences du squelette plasmidique de PV-GHBK04 n'ont pas été transférées dans le génome de MON 531. Enfin, le gène *aad* était présent, mais il n'a pas été exprimé car il est contrôlé par un promoteur bactérien.

Nombre de sites d'insertion : Le nombre de sites où l'ADN transformant (cassettes des gènes *cry2Ab* et *uidA*) a été inséré dans le génome de la lignée MON 15985 a été déterminé en analysant, par transfert de Southern, l'ADN génomique digéré par l'endonucléase de restriction *ScaI*. Comme cette enzyme ne provoque pas de coupure à l'intérieur de l'ADN inséré, le nombre de fragments d'hybridation avec l'ADN du plasmide PV-GHBK11 marqué au ^{32}P correspond au nombre de sites d'insertion. Chaque site d'insertion ne devrait produire qu'un seul fragment d'hybridation sur les transferts de Southern.

La Figure 5 montre un transfert de Southern de l'ADN génomique isolé des lignées DP50 (coton non transgénique), DP50B (lignée transgénique MON531) et MON 15985, digéré par l'endonucléase de restriction *ScaI*. Un mélange, formé d'ADN du génome de DP50 et d'ADN du plasmide PV-GHBK11 digéré par *XbaI*, a été aussi été inclus dans la gélose comme témoin positif. Le fragment PV-GHBK11 radiomarqué illustré a été utilisé comme sonde pour le transfert de Southern (Figure 5).

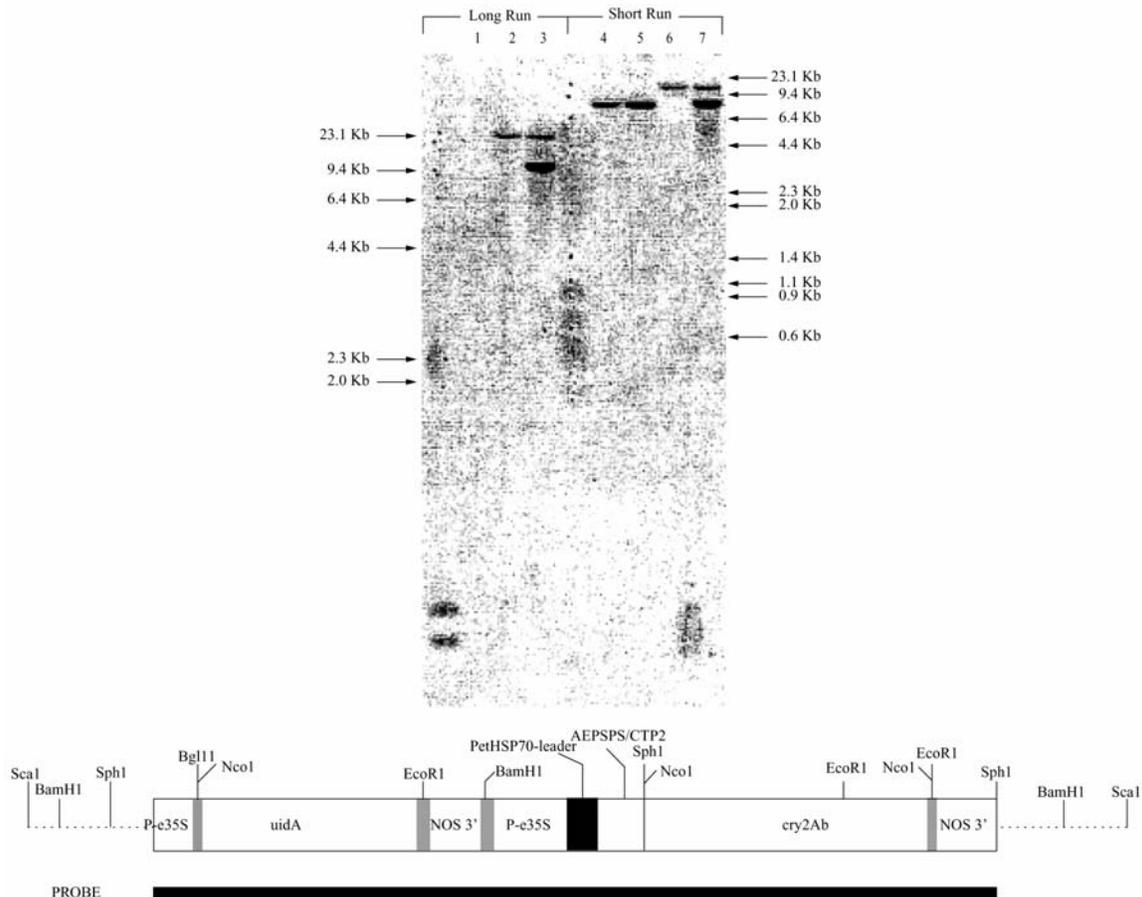


Figure 5 Analyse par transfert de Southern de la lignée MON 15985 : Détermination des sites d'insertion
 Ten µg of DP50, DP50B and MON15985 genomic DNA isolated from leaf tissue were digested with *ScaI*. Samples were separated by alkaline gel electrophoresis, blotted onto nylon membranes and probed with the ³²P-labelled PV-GHBK11 DNA fragment illustrated, washed and subjected to autoradiography. Molecular size markers are indicated. Lane designation: 1) DP50, Long run; 2) DP50B, Long run; 3) MON15985, Long run; 4) DP50 spiked with 5.15 pg *XbaI*-digested plasmid PV-GHBK11 DNA, Short run; 5) DP50 spiked with 10.3 pg *XbaI*-digested plasmid PV-GHBK11, Short run; 6) DP50B, short run; 7) MON15985, Short run.

Le mélange d'ADN de PV-GHBK11 et de DP50, digéré par les enzymes *ScaI* et *XbaI* (Figure 5, pistes 4 et 5), a produit une seule bande d'hybridation à environ 8,7 kb, ce qui correspond à la taille du plasmide (Figure 1). L'ADN de la lignée témoin DP50 n'a présenté aucune hybridation avec la sonde (piste 1), mais l'ADN de DP50B digéré par *ScaI* (pistes 2 et 6) a produit deux bandes d'hybridation d'environ 22 kb et 15 kb (faible). Comme ces bandes étaient présentes dans les lignées MON 15985 et DP50B, mais absentes de la lignée DP50 (piste 1), il a été déterminé qu'elles étaient associées au gène *cryIAc* inséré dans la lignée DP50B. La lignée MON 15985 (pistes 3 et 7) a produit une seule bande d'hybridation, absente des lignées DP50 (piste 1) et DP50B (pistes 2 et 6), à environ 9,3 kb. Ce résultat porte à croire que la lignée MON 15985 contient un seul insert d'ADN.

Analyse du nombre de copies. Le nombre de copies du gène *cry2Ab* peut être déterminé en utilisant une enzyme de restriction qui n'effectue qu'une seule coupure dans l'ADN de

transformation, ce qui devrait donner deux bandes d'hybridation pour chaque copie de l'insert dans le génome. L'ADN génomique isolé des échantillons foliaires prélevés des lignées MON 15985, DP50 et DP50B, de même que l'ADN du plasmide PV-GHBK11 mélangé à l'ADN de DP50, ont été digérés par *SphI* qui n'effectue qu'une coupure dans l'ADN inséré (PV-GHBK11L), à l'intérieur du gène *cry2Ab* (Figure 1). Le fragment de PV-GHBK11 radiomarqué illustré a été utilisé comme sonde pour le transfert de Southern obtenu avec cet ADN (Figure 6).

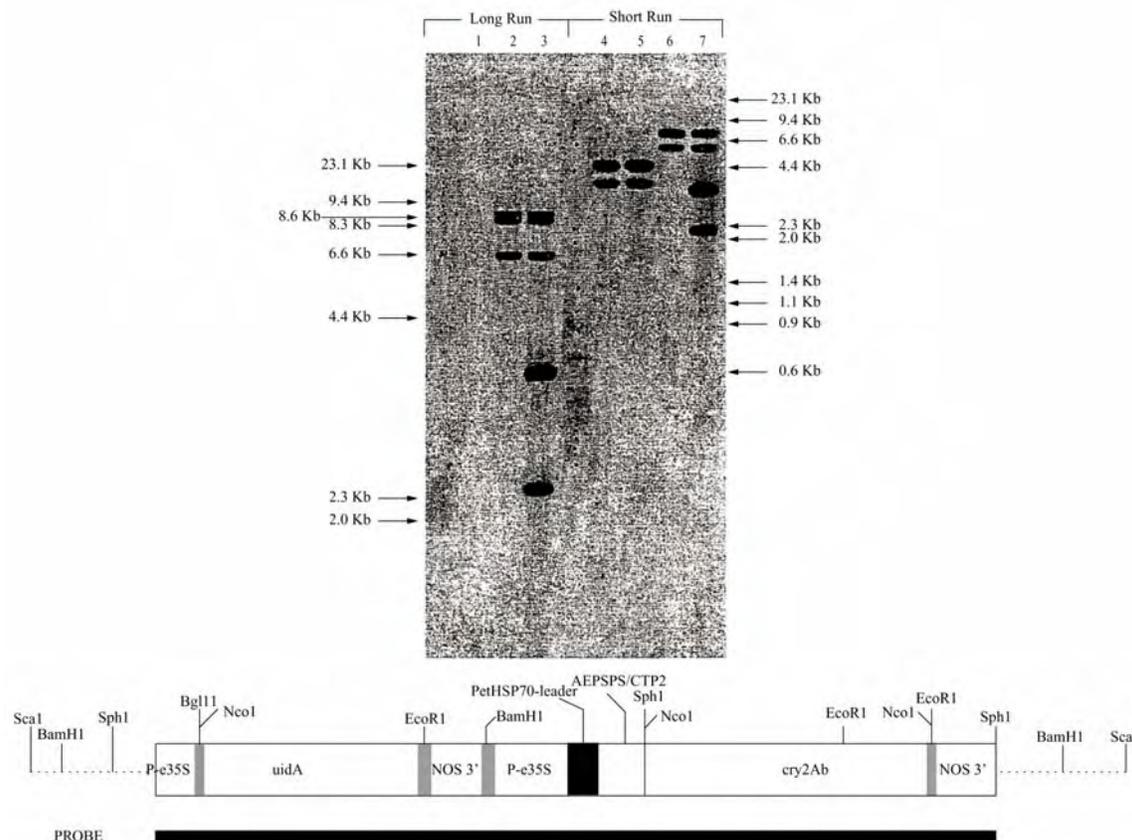


Figure 6 Analyse par transfert de Southern de la lignée MON 15985 : Analyse du nombre de copies.

Ten μg of DP50, DP50B and MON 15985 genomic DNA isolated from leaf tissue were digested with *SphI*. The blot was probed with the ^{32}P -labeled PV-GHBK11 fragment shown. Lane designation: 1) DP50, Long run; 2) DP50B, Long run; 3) MON 15985, Long run; 4) DP50 spiked with 5.15 μg of PV-GHBK11, Short run; 5) DP50 spiked with 10.3 μg of PV-GHBK11, Short run; 6) DP50B, Short run; 7) MON 15985, Short run.

→ symbol denotes size of DNA in kb, obtained with MW markers.

Aucune hybridation n'a été observée entre la sonde et le témoin non transgénique – la lignée DP50 (Figure 6, piste 1). Le plasmide PV-GHBK11 mélangé à l'ADN de DP50 (pistes 4 et 5) a produit des bandes d'hybridation à environ 3,9, 4,8 et 8,7 Kb (faible), la faible bande d'environ 8,7 Kb correspondant à l'ADN plasmidique non digéré. La lignée DP50B (pistes 2 et 6) a produit trois bandes d'hybridation à environ 6,4, 8,3 et 8,6 kb. La présence de ces bandes dans la lignée MON 15985 et le témoin DP50B laisse croire qu'elles sont associées au gène *cryIAC* inséré. La lignée MON 15985 a produit deux bandes uniques (pistes 3 et 7), à environ 2,3 kb et 3,5 kb. Or comme l'enzyme *SphI* ne

produit qu'une cassure à l'intérieur de l'ADN inséré, ces deux bandes laissent croire que la lignée MON 15985 contient une seule copie de l'ADN intégré. Aucun autre insert plus petit n'a été détecté.

Analyse de l'intégrité de la région codante de *cry2Ab*. On a eu recours à la digestion par une enzyme de restriction effectuant une cassure à chaque extrémité du gène *cry2Ab*, pour déterminer si tout le gène *cry2Ab* avait été inséré dans la lignée MON 15985. L'ADN génomique isolé des échantillons de feuille de MON 15985, DP50 et DP50B, ainsi que l'ADN de PV-GHBK11 mélangé à l'ADN de DP50, ont été digérés par l'enzyme *NcoI* pour exposer la région codante de *cry2Ab*. La région codante pleine longueur radiomarquée de *cry2Ab* a été utilisée comme sonde pour le transfert de Southern de cet ADN (1,9 kb; Figure 7).

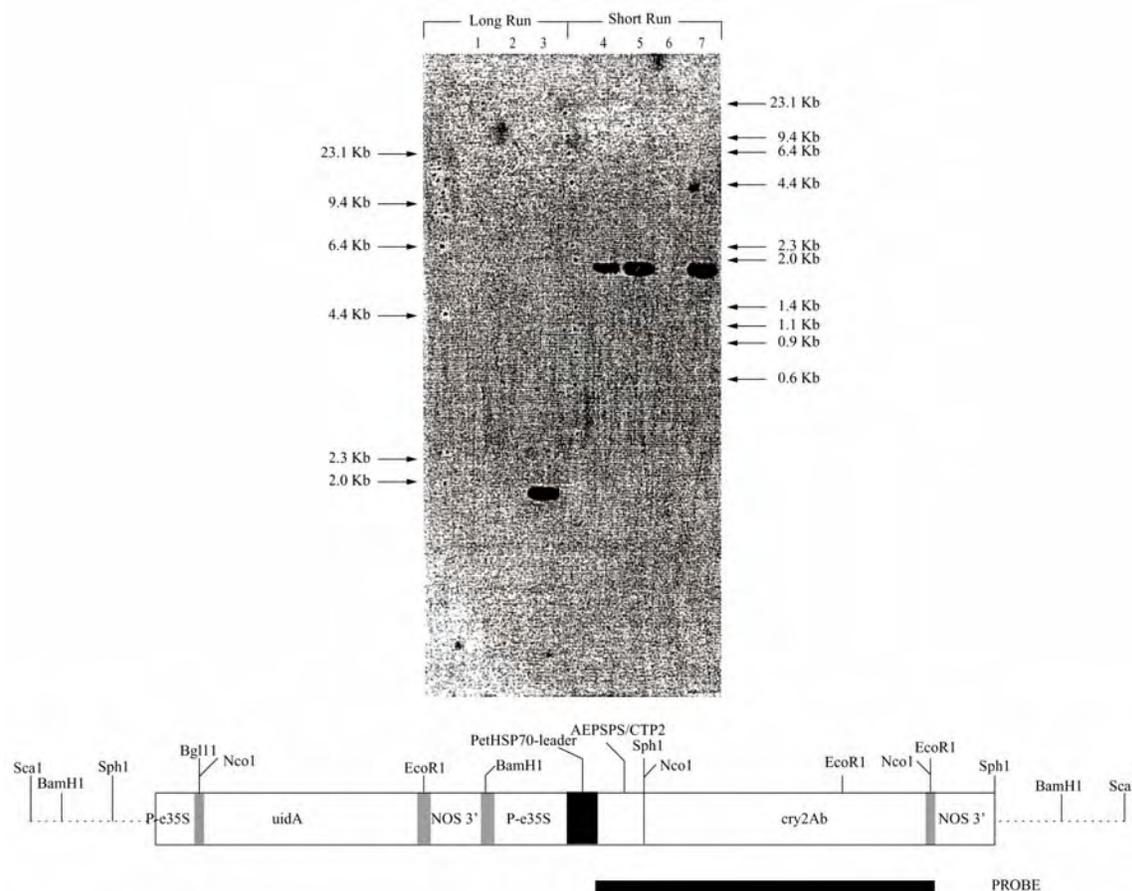


Figure 7 Analyse par transfert de Southern de la lignée MON 15985 : Intégrité de la région codante de *cry2Ab*. Ten µg of DP50, DP50B and MON 15985 genomic DNA isolated from leaf tissue were digested with *NcoI*. The blot was probed with the ³²P-labeled *cry2Ab* coding region shown on the plasmid diagram. Lane designation: 1) DP50, Long run; 2) DP50B, Long run; 3) MON 15985, Long run; 4) DP50 spiked with 5.15 pg of PV-GHBK11, Short run; 5) DP50 spiked with 10.3 pg of PV-GHBK11, Short run; 6) DP50B, Short run; 7) MON 15985, Short run.

→ symbol denotes size of DNA in kb, obtained with MW markers.

La lignée non transgénique témoin DP50 (Figure 7, piste 1) et la lignée témoin DP50B (pistes 2 et 6) n'ont produit aucune bande d'hybridation détectable. Le plasmide

PV-GHBK11 mélangé à l'ADN de DP50 (pistes 4 et 5) a produit une bande d'environ 1,9 kb correspondant à l'ensemble de la région codante de *cry2Ab* (Figure 1). Une seule bande d'hybridation de 1,9 kb a aussi été obtenue avec la lignée MON 15985 (Figure 1, pistes 3 et 7), elle aussi correspondant à la région codante intacte de *cry2Ab*. Ce résultat indique que la lignée MON 15985 contient un gène *cry2Ab* intact.

La demande a aussi présenté les résultats d'analyses de l'intégrité de la cassette d'expression du gène *cry2Ab*, réalisées avec les sondes suivantes : une cassette pleine longueur de *cry2Ab*; un promoteur amélioré du virus CaMV et une sonde NOS. Ces données n'ont pas été incluses ici, mais toutes confirment l'intégrité de la cassette d'expression de *cry2Ab* et l'absence d'inserts additionnels de tout élément génétique.

Analyse de l'intégrité de la région codante de *uidA*. On a eu recours à la digestion par des enzymes de restriction effectuant des cassures à chaque extrémité du gène *uidA*, pour déterminer l'intégrité de ce gène inséré. L'ADN génomique isolé d'échantillons foliaires prélevés des lignées MON 15985, DP50 et DP50B, ainsi que l'ADN du plasmide PV-GHBK11 mélangé à l'ADN de DP50, ont été digérés par les enzymes *EcoRI* et *BglII* pour libérer l'entière région codante du gène *uidA*. La région codante pleine longueur radiomarquée de *uidA* a été utilisée comme sonde pour le transfert de Southern obtenu à partir de cet ADN (1,87 kb; Figure 8).

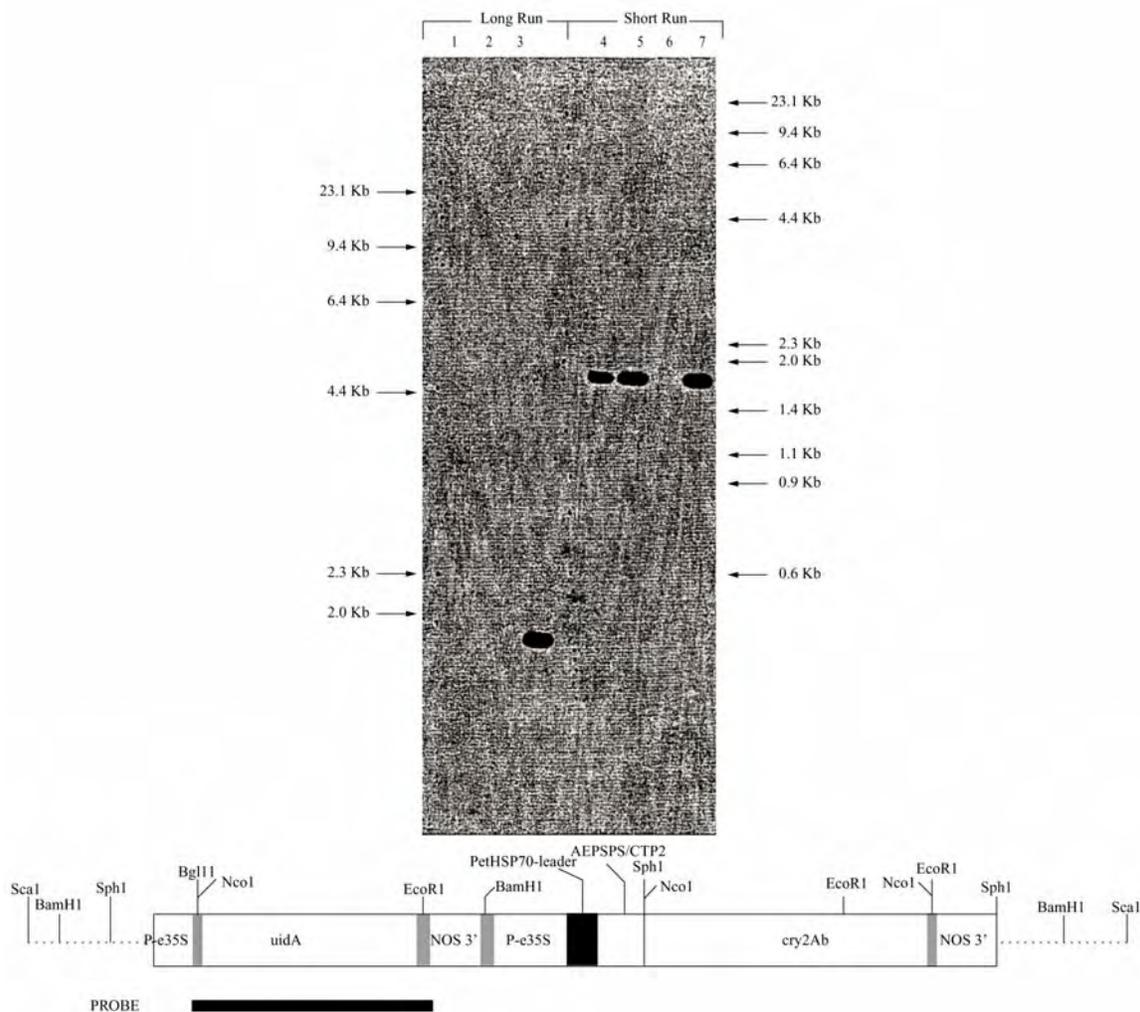


Figure 8 Analyse par transfert de Southern de la lignée MON 15985 : Intégrité de la région codante de *uidA*. Ten µg of DP50, DP50B and MON 15985 genomic DNA isolated from leaf tissue were digested with *EcoRI* and *BglIII*. The blot was probed with the ³²P-labeled *uidA* coding region shown. Lane designation: 1) DP50, Long run; 2) MON DP50B, Long run; 3) 15985, Long run; 4) DP50 spiked with 5.15 pg of PV-GHBK11, Short run; 5) DP50 spiked with 10.3 pg of PV-GHBK11, Short run; 6) DP50B, Short run; 7) MON 15985, Short run.

→ symbol denotes size of DNA in kb, obtained with MW markers.

Les témoins DP50 (Figure 8, piste 1) et DP50B (pistes 2 et 6) n’ont produit aucune bande d’hybridation détectable. Le mélange d’ADN de PV-GHBK11 et de DP50 (pistes 4 et 5) a produit une bande d’hybridation d’environ 1,9 kb correspondant à la totalité de la région codante de *uidA*. L’ADN de MON 15985 (pistes 3 et 7) a aussi produit une bande unique d’environ 1,9 kb, ce qui indique que cette lignée contient la région codante intacte de *uidA*.

Analyse de l’intégrité de la cassette d’expression du gène *uidA*. On a eu recours à la digestion par deux enzymes de restriction effectuant des cassures à chaque extrémité de la cassette d’expression du gène *uidA*, pour s’assurer que MON 15985 contenait toute la cassette d’expression. L’ADN génomique isolé d’échantillons foliaires de MON 15985,

DP50 et DP50B a été digéré par les enzymes *Bam*HI et *Sph*I pour libérer la totalité de la cassette d'expression de *uidA* contenant la séquence codante de *uidA*, le promoteur 35S amélioré du virus CaMV et le signal de polyadénylation NOS 3' (Figure 9). L'ADN du plasmide PV-GHBK11 a été digéré par l'enzyme *Pst*I puis ajouté à l'ADN de DP50 pour former l'échantillon de courte durée. La région codante radiomarquée illustrée de *uidA* a été utilisée comme sonde pour le transfert de Southern (Figure 9).

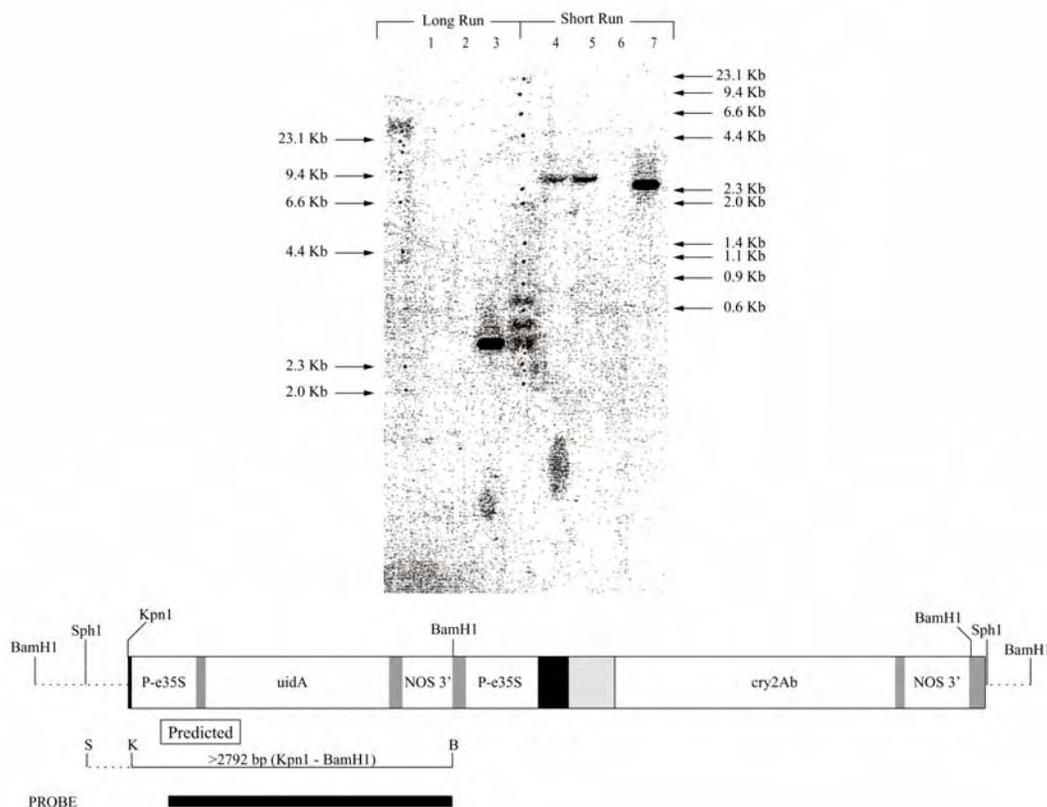


Figure 9 Analyse par transfert de Southern de la lignée MON 15985 : Intégrité de la cassette d'expression de *uidA* – sonde *uidA*.

Ten µg of DP50, DP50B and MON 15985 genomic DNA isolated from leaf tissue were digested with *Bam*HI and *Sph*I. PV-GHBK11 DNA was digested with *Pst*I and added to the DP50 DNA samples prior to precipitation. The blot was probed with ³²P-labeled *uidA* coding region. Lane designation: 1) DP50, Long run; 2) DP50B, Long run; 3) MON 15985, Long run; 4) DP50 spiked with 5.15 µg of PV-GHBK11, Short run; 5) DP50 spiked with 10.3 µg of PV-GHBK11, Short run; 6) DP50B, Short run; 7) MON 15985, Short run.

→ symbol denotes size of DNA in kb, obtained with MW markers.

L'ADN de la lignée non transgénique DP50 (Figure 9, piste 1) et l'ADN de DP50B (pistes 2 et 6) n'ont produit aucune bande d'hybridation. Le mélange d'ADN du plasmide PV-GHBK11 et d'ADN de DP50 (pistes 4 et 5) a produit une bande de 2,8 kb correspondant à la cassette d'expression intégrale de *uidA* (qualifiée ici de fragment « predicted »). La lignée MON 15985 (pistes 3 et 7) a produit une bande d'environ 2,5 kb, ce qui porte à croire qu'une portion de la cassette d'expression de *uidA* était manquante; cette hypothèse a été confirmée par les résultats de l'analyse par PCR de la jonction 5' de l'insert, qui ont révélé l'absence d'un fragment d'environ 260 pb du

promoteur 5' et d'un autre de 24 pb sur le lieu multisé. Selon Odell *et al.* (1985), toutefois, une délétion de ce type ne devrait pas influencer l'exactitude de l'initiation de la transcription. Aucune autre bande n'a été détectée avec la sonde de la région codante de *uidA*.

Analyse de la présence du squelette plasmidique. Afin de confirmer que l'insert ne contenait pas d'ADN du plasmide PV-GHBK 11, outre le fragment excisé par *KpnI* utilisé pour la transformation (le squelette plasmidique – Figure 9), cette région du plasmide a été utilisée comme sonde pour l'hybridation sur transfert de Southern. L'ADN génomique isolé des échantillons foliaires prélevés de MON 15985, DP50 et DP50B, ainsi que le mélange d'ADN de PV-GHBK11 et de DP50, ont été digérés par l'enzyme *KpnI*, pour libérer la totalité de l'insert d'ADN. La séquence radiomarquée du squelette de PV-GHBK11, *c.-à-d.* l'ADN vecteur n'ayant pas servi à la transformation, a été utilisée comme sonde pour le transfert de Southern (Figure 10).

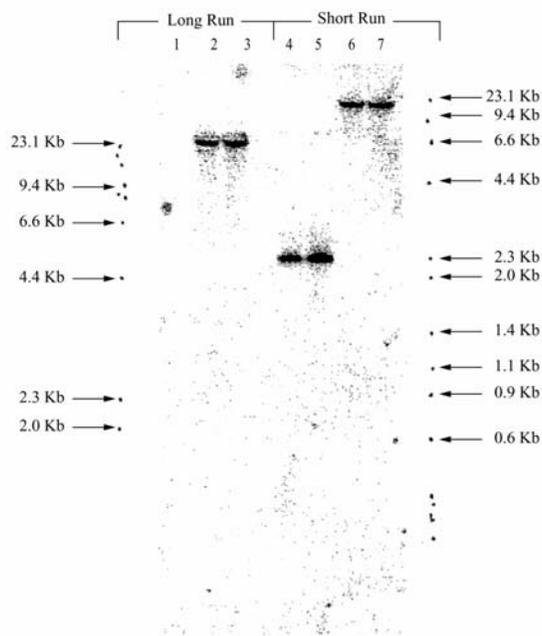


Figure 10 Analyse par transfert de Southern de la lignée MON 15985 : Analyse des séquences squelettiques. Ten µg of DP50, DP50B and MON 15985 genomic DNA isolated from leaf tissue were digested with *KpnI*. The blot was probed with the ³²P-labeled PV-GHBK11 backbone sequence (not shown). Lane designation: 1) DP50, Long run; 2) DP50B, Long run; 3) MON 15985, Long run; 4) DP50 spiked with 5.15 pg of PV-GHBK11, Short run; 5) DP50 spiked with 10.3 pg of PV-GHBK11, Short run; 6) DP50B, Short run; 7) MON 15985, Short run.

→ symbol denotes size of DNA in kb, obtained with MW markers.

L'ADN de DP50 (Figure 10, piste 1) n'a produit aucune bande d'hybridation détectable. Le mélange d'ADN du plasmide PV-GHBK11 et d'ADN de DP50 (pistes 4 et 5) a produit une bande d'environ 2,6 kb représentant la totalité de la séquence du squelette dans l'ADN de PV-GHBK11. L'ADN de DP50B (pistes 2 et 6) a produit une bande unique d'environ 22 kb, également présente dans MON 15985 et considérée comme la bande de bruit de fond associée au gène *cryIAc*. L'ADN de MON 15985 (pistes 3 et 7) contenait cette bande d'environ 22 kb, mais n'a produit aucun autre signe d'hybridation.

Ce résultat laisse croire que la lignée MON 15985 ne contient pas les séquences du squelette de PV-GHBK11 issues de la transformation.

Analyse des séquences d'ADN encadrant l'insert. Il est utile d'identifier les séquences de jonction entre l'insert et l'ADN génomique de l'hôte, pour identifier la lignée. La technique du Genome Walker a été utilisée pour déterminer la séquence d'ADN génomique encadrant les deux extrémités de l'insert d'ADN, et des amorces de PCR ont été utilisées pour amplifier les régions de jonction (Figure 11). L'ADN de DP50 (non transgénique), de DP50B (MON 531) et d'un autre gène *cry2Ab* (MON 15813) a été utilisé comme témoins.

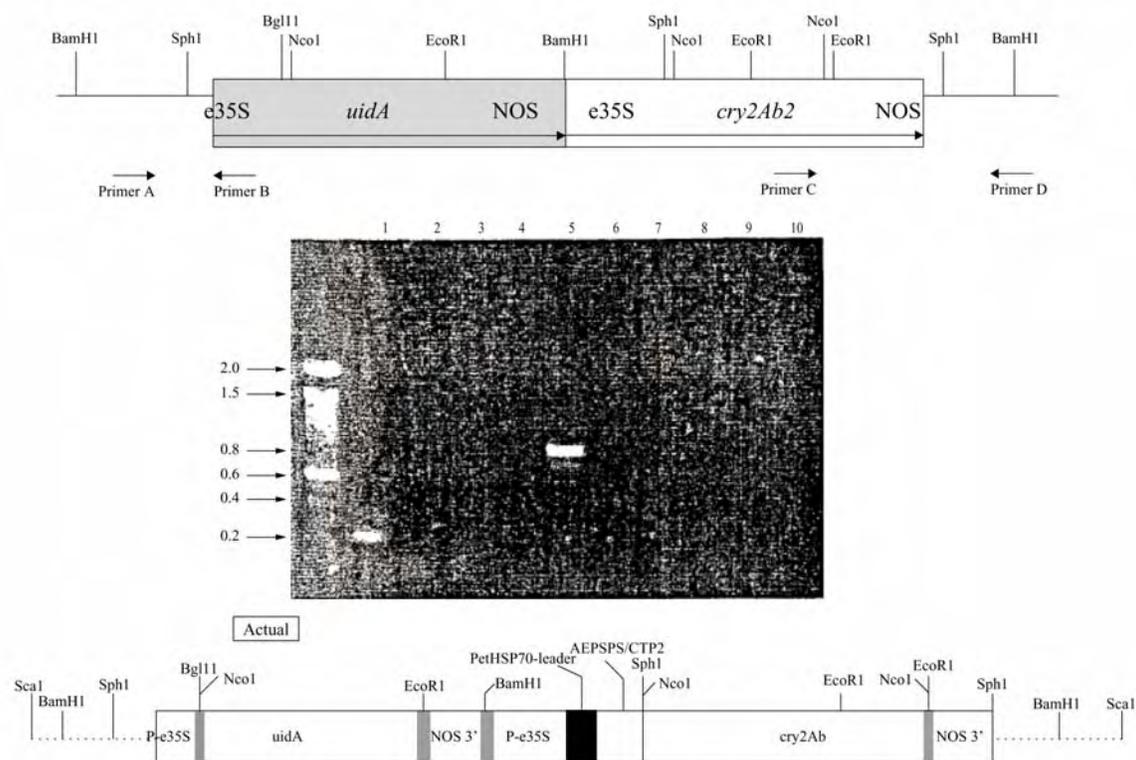


Figure 11 Confirmation par PCR des séquences des extrémités 5' et 3' de l'insert dans la lignée MON 15985.

PCR was performed using primers specific to the 5' and 3' border sequences for MON 15985 on genomic DNA isolated from leaf tissue for DP50 (non-transgenic control), DP50B (*cry1Ac* control), an alternate *cry2Ab* event and MON 15985. DNA was amplified with primers A and B from the 5' end of MON 15985 and Primers C and D from the 3' end of MON 15985. Lane designations: 1) 10 µl of 5' MON 15985 reaction product; 2) 10 µl of 5' alternate *cry2Ab* reaction product; 3) 10 µl of 5' DP50 (non-transgenic) negative control reaction product; 4) 10 µl of 5' DP50B (*cry1Ac*) negative control reaction product; 5) 10 µl of 3' MON 15985 reaction product; 6) 10 µl of 3' alternate *cry2Ab* reaction product; 7) 10 µl of 3' DP50 (non-transgenic) negative control reaction product; 8) 10 µl of 3' DP50B (*cry1Ac*) negative control reaction product; 9) 10 µl of 5' no template negative control reaction product; 10) 10 µl of 3' no template negative control reaction product.

→ symbol denotes size of DNA in kb, obtained with MW markers.

Résultats. Les échantillons non transgéniques n'ont révélé aucun produit de PCR, quel que soit le jeu d'amorces (5' ou 3') utilisé (Figure 12, pistes 3 et 7). De même, l'échantillon DP50B (*cry1Ac*) n'a pas révélé de produits de PCR avec l'une ou l'autre amorce (pistes 4 et 8), pas plus que le gène *cry2Ab* substitut (15813) (pistes 2 et 6).

Cependant, la lignée MON 15985 a donné un produit de 230 pb à l'extrémité 5', avec les amorces A et B (piste 1), et un produit de 869 pb à l'extrémité 3' avec les amorces C et D (piste 5). Ces produits étaient de la taille prévue pour contenir les séquences encadrant les extrémités 5' et 3' du gène *cry2Ab* inséré dans la lignée MON 15985 obtenue avec les paires d'amorces (Figure 11). Cette étude confirme les séquences de bordure de l'insert dans la lignée MON 15985 et montre que ces amorces peuvent être utilisées pour distinguer cette lignée des autres lignées de coton Bt.

Résumé de l'analyse moléculaire de la lignée MON 15985. La lignée de coton MON 15985 a été produite par la technique de bombardement au moyen de particules, en utilisant un segment d'ADN du plasmide PV-GHBK11 digéré par KpnI et contenant les gènes *cry2Ab* et *uidA*. La lignée MON 15985 contenait un nouvel insert d'ADN qui a été localisé sur un segment *ScaI* de 9,3 kb; cet insert présentait une copie intégrale de la cassette d'expression de *cry2Ab* liée à une copie de la cassette d'expression du gène *uidA*. Malgré l'absence d'un fragment d'environ 260 pb à l'extrémité 5' du promoteur 35S amélioré du virus CaMV, cette dernière cassette était fonctionnelle. Enfin, aucune séquence du squelette du plasmide PV-GHBK11 n'a été détectée dans la lignée MON 15985, et les séquences aux jonctions 5' et 3' de l'insert dans le génome du végétal ont été confirmées par PCR. La Figure 13 présente une carte de restriction de l'insert dans la lignée 15985 et le Tableau 9 donne un résumé de la caractérisation moléculaire de cette lignée.

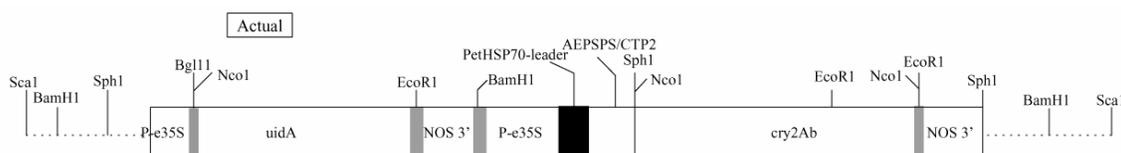


Figure 12 Carte de restriction de l'insert dans la lignée MON 15985.

Tableau 9 Résumé de la caractérisation moléculaire de MON 15985

No. of insertions	1
No. of copies of the <i>cry2Ab</i> and <i>uidA</i> expression cassettes	1 of each
Genetic elements:	
enhanced CaMV 35S promoter for <i>uidA</i>	Intact with 260 bp missing from 5' end
<i>uidA</i> coding region	Intact
NOS 3' polyadenylation for <i>uidA</i>	Intact (data not shown)
enhanced CaMV 35S promoter for <i>cry2Ab</i>	Intact (data not shown)
NOS 3' polyadenylation for <i>cry2Ab</i>	Intact (data not shown)
Backbone DNA	None detected

9.A-5 Stabilité et hérédité génétiques

L'hérédité et la stabilité de chaque gène fonctionnel qui est introduit dans un végétal transformé doivent être déterminées. Pour chaque gène nouveau, il faut ainsi établir le profil d'hérédité et la stabilité de la transmission des caractères héréditaires, ainsi que le niveau d'expression du caractère exprimé par le gène. L'hérédité peut être déterminée par des méthodes utilisant l'ADN, par analyse des produits géniques ou par analyse du phénotype produit par le gène, par exemple la résistance aux insectes. Le niveau d'expression des protéines est habituellement mesuré par des techniques sérologiques,

qui peuvent être qualitatives [p. ex., transfert Western, dosage immunoenzymatique (ELISA), etc.] ou quantitatives (p. ex., ELISA, dosage radio-immunologique, etc.). Si le nouveau caractère ne résulte pas de l'expression d'une protéine nouvelle ou modifiée (p. ex., plantes transgénique dans lesquelles des séquences anti-sens ont été insérées, comme la tomate Flavr Savr^{MC} qui contient une séquence anti-sens correspondant au gène codant pour la polygalacturonase), l'hérédité peut alors être évaluée en examinant directement l'insert d'ADN ou en mesurant la production de transcrit d'ARN.

Pour déterminer le profil d'hérédité du gène *cry2Ab* introduit dans la lignée MON 15985, un dosage immunoenzymatique (ELISA) qualitatif de Cry2Ab2 a été réalisé sur des populations en ségrégation issues de quatre générations obtenues conformément au modèle illustré à la Figure 13. Les résultats obtenus sont présentés au Tableau 10. La signification statistique des données de ségrégation a été déterminée par un test du chi carré. De plus, l'ADN génomique de plantes des générations R1, R2, R3 et R4 et de deux lignées obtenues par rétrocroisement (BC2F3, Figure 13) a été digéré, transféré et sondé avec l'entière région codante de *cry2Ab*, pour évaluer la stabilité de l'ADN inséré. Pour ces analyses, on a utilisé l'enzyme de restriction *SphI*, car elle produit un spectre de bandes unique sur le transfert de Southern, lorsque la lignée MON 15985 est sondée avec toute la région codante de *cry2Ab*. Une technique similaire avait été utilisée pour déterminer la stabilité de l'hérédité de l'insert fonctionnel dans la lignée MON 531 avant d'en autoriser l'utilisation, et cette stabilité a depuis été confirmée par des générations d'usage commercial dans le monde entier.

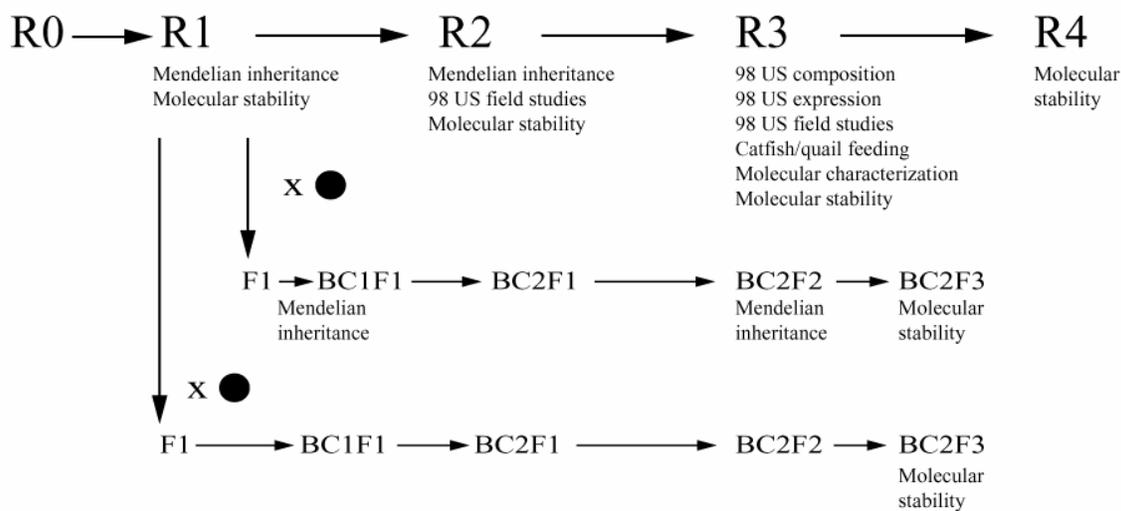


Figure 13 Carte de la descendance de plusieurs générations de la lignée de coton MON 15985 utilisées pour des analyses précises.

Tableau 10 Données de ségrégation et analyse de la descendance de la lignée de coton MON 15985

Generation ²	Expected		Observed ¹		ChiSq
	Positive	Negative	Positive	Negative	
R1 (3:1)	202.5	67.5	210	60	1.11 ns
R2 (3:1)	45	15	43	17	0.356 ns
BC1F1 (1:1)	199	199	213	185	1.970 ns
BC2F2 (3:1)	568	189	549	208	2.477 ns

1. Data expressed as number of positive and negative plants based on Cry2Ab qualitative ELISA.

2. R1 seed was from initial R0 transformant in a DP50B background.

R2 seed was pooled from heterozygous R1 plants in a DP50B background.

BC1F1 and BC2F2 plants were pooled from five different elite cultivar backgrounds.

ns = Not significant at $p=0.05$ (chi square = 3.84, 1 df).

La ségrégation dans toutes les générations s'est faite comme prévu, en fonction d'un seul site d'insertion. Chez les descendants R1 de MON 15985, la détection de la protéine Cry2Ab2 a produit le ratio de ségrégation prévu (3 : 1). Les descendants de MON 15985 rétrocroisés avec des cultivars de coton commercial ont eux aussi produit le ratio de ségrégation prévu (environ 1:1), relativement à la protéine Cry2Ab2. De plus, l'analyse des résultats de ségrégation par le test du chi carré a révélé que le profil de ségrégation est compatible avec la présence d'un seul site actif d'insertion dans l'ADN génomique du coton, dont la ségrégation suit les lois de la génétique mendélienne. Ces données confirment que la lignée MON 15985 contient un seul insert d'ADN, dont la ségrégation suit les lois de la génétique mendélienne et dont la stabilité d'intégration dans le génome végétal a été confirmée sur plusieurs générations successives obtenues par autofécondation et rétrocroisements.

La stabilité de l'insert d'ADN dans la lignée MON 15985 et l'expression des protéines exogènes sur cinq générations ont été confirmées par des transferts de Southern, des tests ELISA et des transferts Western (Bookout *et al.*, 2001, Pineda *et al.*, 2002), réalisés sur des générations multiples. Aucune hybridation n'a été observée entre l'ADN de la lignée non transgénique témoin et l'ADN parental témoin et le gène *cry2Ab*. Les bandes d'hybridation pour l'ADN extrait des cinq générations ont été les mêmes et n'ont montré aucune différence (données non fournies), ce qui témoigne de la stabilité de l'insert dans les générations successives.

Sur la base de ces données, rien ne porte à croire à l'instabilité génétique de l'ADN inséré dans la lignée MON 15985. D'autres données (non présentées) indiquent que la ségrégation des gènes *cry1Ac* et *cry2Ab* se fait séparément et que l'insertion de ces gènes se fait à des endroits différents dans le génome de la plante. Enfin, les données recueillies sur plusieurs générations obtenues par croisements et rétrocroisements, et faisant état de l'absence de variation importante dans les ratios de ségrégations prévus pour les deux gènes insecticides, confirment le maintien des gènes *cry1Ac* et *cry2Ab* comme des caractères mendéliens dominants uniques (Shappley, 2002).

9.B MATÉRIEL EXPRIMÉ

Pour identifier les risques, il faut connaître lesquels des gènes introduits sont exprimés, les caractéristiques, la concentration et l'emplacement des produits exprimés et les conséquences de l'expression. Lorsque la modification a pour résultat l'expression d'une protéine nouvelle ou d'un polypeptide nouveau, il faut déterminer les éléments suivants

de ce matériel : l'identité, la fonctionnalité et, le cas échéant, la similarité avec des produits provenant de sources classiques. Les données d'expression aident à déterminer le niveau d'exposition dans l'environnement aux protéines nouvelles et sont utiles pour déterminer l'efficacité du produit ainsi que la sensibilité de la culture à développer une résistance aux insectes.

La concentration de la protéine nouvelle exprimée dans les tissus de plantes transgéniques peut être très faible, souvent bien inférieure à 0,1 % du poids sec. Des études telles que les essais de toxicité aiguë, qui nécessitent des quantités relativement importantes de matériel, ne sont pas souvent envisageables si l'on veut utiliser 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. Lorsque cette équivalence est établie sur la base de l'activité sérologique croisée, il est important d'utiliser des antisérums (polyclonaux ou monoclonaux) dont la spécificité est bien caractérisée.

Il faut aussi tenir compte de la possibilité d'une modification post-traductionnelle (p. ex., d'une glycosylation) dans des systèmes eucaryotiques dans la mesure où elle peut affecter le potentiel allergène.

Dans les cas où la modification aboutit à l'expression d'un transcrit d'ARN nouveau qui ne peut être traduit, il faut déterminer la sensibilité et la spécificité de l'action recherchée. On peut en citer comme exemples la production d'ARNm anti-sens ou d'autres espèces d'ARN entraînant une diminution de la production d'une protéine endogène (c'est-à-dire des plantes transgéniques renfermant des séquences anti-sens insérées).

9.B-1 Niveaux d'expression des protéines dans différents tissus végétaux

Les concentrations en protéines Cry2Ab2 et GUS ont été déterminées dans des échantillons prélevés en 1998 dans huit endroits des États-Unis où ont été menés des essais au champ; ces endroits représentaient les principales régions productrices de coton et diverses conditions environnementales aux États-Unis. Les parcelles d'essais du Texas et de l'Arizona reflétaient les cultures de coton "ordinaires", tandis que les parcelles situées au Mississippi, en Caroline du Sud et en Alabama étaient caractéristiques des régions et des conditions de culture du sud et du sud-est. La lignée MON 15985 et les lignées de coton témoins ont été cultivées avec succès et récoltées dans des conditions typiques de à chaque région.

En Louisiane, en Caroline du Sud et au Texas, les essais ont été réalisés en blocs uniques formés de deux lignes-parcelles de 15 pi, tandis que quatre blocs répétés de 15 pi ont été utilisés au Mississippi, en Alabama, en Louisiane et en Arizona. Au site d'essai de Starkville (Mississippi), les lignées expérimentale et témoin ont toutefois été plantées en bloc unique, dans des parcelles formées d'une seule rangée de 30 pi. L'échantillonnage a été fait comme suit :

Jeunes feuilles : À chaque endroit, les premières feuilles nouvellement développées et mesurant environ 25 cm² ont été prélevées de six plantes par parcelle, 28 jours après les semis. Les sous-échantillons ont été pulvérisés sur la glace sèche, avant d'être analysés.

Graines de coton : Du coton-graine en vrac (2 kg) a été recueilli à chaque endroit. L'égrenage et le délintage par l'acide du coton-graine ont été réalisés aux installations de recherche de Monsanto à St. Louis. Les sous-échantillons ont été pulvérisés sur la glace sèche avant d'être analysés.

Feuilles saisonnières : De jeunes feuilles terminales, pleinement déployées, ont été prélevées de six plantes par parcelle, à peu près toutes les quatre semaines jusqu'au moment précédant immédiatement l'application du défoliant, en Alabama et à un site du Mississippi. Les sous-échantillons ont été pulvérisés sur la glace sèche avant d'être analysés.

Plante entière : Quatre plantes entières, incluant les feuilles, les racines et les tiges mais non les capsules, ont été prélevées dans les parcelles d'essai et les parcelles témoins, en Alabama et dans un site du Mississippi, juste avant l'application du défoliant. Les plantes entières ont été découpées en morceaux de 2 à 3 po. Les sous-échantillons ont été pulvérisés sur la glace sèche avant d'être analysés.

Pollen : Des échantillons de pollen ont été recueillis en Louisiane et dans un site du Mississippi. Le pollen, recueilli d'environ 80 plantes, a été placé dans des tubes gradués étiquetés et les échantillons des divers réplicats ont été regroupés à chaque site, pour obtenir suffisamment de matériel pour les analyses.

Les échantillons prélevés de la lignée MON 15985 et de la lignée parentale témoin (DP50B) ont été conservés dans des conditions visant à en préserver l'intégrité. La teneur en protéine des échantillons a été déterminée par la technique ELISA. (Les méthodes utilisées à cette fin, de même que les tests de validation des dosages, ont été communiqués aux organismes de réglementation, mais ne peuvent être divulgués ici car il s'agit de renseignements commerciaux confidentiels). Les moyennes, intervalles et écarts-types (É.-T.) ont été calculés à partir des données brutes. Le coefficient de variation en pourcentage (% CV) a aussi été calculé; il s'agit essentiellement de l'écart-type exprimé en pourcentage de la moyenne, qui aide à comparer la variabilité sans égard aux valeurs absolues.

Production de la protéine Cry2Ab. La protéine Cry2Ab a été détectée en faibles concentrations dans divers tissus végétaux de la lignée MON 15985 (tableaux 11-15).

Tableau 11 Résumé des concentrations en protéines Cry2Ab2 et GUS dans divers tissus prélevés à différents endroits aux États-Unis, durant la saison au champ 1998

	Young Leaf MPL ¹ ±SD ² (Range) ³	Seed MPL ¹ ±SD ² (Range) ³	Whole Plant MPL ¹ ±SD ² (Range) ³	Pollen MPL ¹ ±SD ² (Range) ³
Cry2Ab2 ⁴				
MON 15985	23.8 ± 6.3 (10.1-33.3)	43.2 ± 5.7 (31.8-50.7)	8.80 ± 1.20 (7.3-10.5)	<0.25
DP50B	<2.65	<2.31	<1.24	<0.25
DP50	<2.65	<2.31	<1.24	<0.25
Gus ⁵				
MON 15985	106 ± 32 (51.7-176)	58.8 ± 13.0 (37.2-82.3)	NA	NA
DP50B	<0.91	<4.42	NA	NA
DP50	<0.91	<4.42	NA	NA

NA = Not Analyzed

1. Mean Protein Levels (µg/g fwt). Protein levels are reported as microgram of protein per gram fresh weight of tissue and have been corrected for overall assay bias.
2. Standard Deviation. The mean and standard deviation were calculated from the analyses of plant samples, one from each of eight field sites except for tissues collected from a single site.
3. Range. Minimum and maximum values from the analyses of samples across sites.
4. The Limit of Detection for the Cry2Ab2 assay is 2.65 µg/g in leaf tissue and 2.31 µg/g in seed tissue. The Limit of Quantification for the Cry2Ab2 assay is 1.24 µg/g in whole plant tissue and 0.25 µg/g in pollen tissue.
5. The Limit of Detection for the GUS assay is 0.91 µg/g in leaf tissue and 4.42 µg/g in seed tissue.

Tableau 12 Concentrations en protéine Cry2Ab2 dans les échantillons de jeunes feuilles de la lignée MON 15985 prélevés à différents endroits aux États-Unis, durant la saison au champ 1998

Site	Mean Cry2Ab2 (µg/g fwt)	% CV	Range (µg/g fwt)	Standard Deviation
Winnsboro, LA ¹	20.2	NA	NA	NA
Florence, SC ¹	14.0	NA	NA	NA
Corpus Christi, TX ¹	33.3	NA	NA	NA
Leland, MS ²	15.9	19.7	12.4-20.0	3.1
Loxley, AL ³	21.0	23.4	15.5-24.9	4.9
Bossier City, LA ²	14.8	14.2	12.2-16.7	2.1
Maricopa, AZ ²	10.7	5.7	10.1-11.3	0.6
Starkville, MS ¹	27.3	NA	NA	NA

NA = Not Analyzed

1. The % CV, range or standard deviation are not reported since there was only one plot.
2. The % CV, range and standard deviation for this site are from four replicate plots.
3. The % CV, range and standard deviation for this site are from three replicate plots.

Tableau 13 Concentrations en protéine Cry2Ab2 dans les échantillons de feuilles saisonnières de la lignée MON 15985 prélevés à différents endroits aux États-Unis, en 1998

	28 DAP* MPL ¹ ±SD ² (Range) ³	55 DAP MPL ¹ ±SD ² (Range) ³	85 DAP MPL ¹ ±SD ² (Range) ³	108 DAP MPL ¹ ±SD ² (Range) ³
MON 15985	21.0 ± 4.9 (15.5 - 24.9)	40.1 ± 6.5 (34.6 - 49.4)	19.7 ± 2.7 (15.9 - 21.8)	16.7 ± 0.6 (15.8 - 17.3)
DP50B	<2.65	<2.65	<2.65	<2.65
DP50	<2.65	<2.65	<2.65	<2.65

1. Mean Cry2Ab2 protein levels (µg/g fwt). Protein levels are reported as microgram of protein per gram fresh weight of tissue and corrected for overall assay bias. The value was estimated from the analyses of four samples from Loxley, AL site. The Limit of Detection for the Cry2Ab2 assay is 2.65 µg/g in leaf tissue.
2. Standard Deviation. The mean and standard deviation were calculated from the analyses of plant samples, one from each of eight field sites except for tissues collected from a single site.
3. Range. Minimum and maximum values from the analyses of samples across eight sites.

* DAP = days after planting

Tableau 14 Concentrations en protéine Cry2Ab2 dans les échantillons de graines de la lignée MON 15985, prélevés à différents endroits aux États-Unis, durant la saison au champ 1998

Site	Mean Cry2Ab2 (µg/g fwt)	% CV	Range (µg/g fwt)	Standard Deviation
Winnsboro, LA ¹	46.7	NA	NA	NA
Florence, SC ¹	34.3	NA	NA	NA
Corpus Christi, TX ¹	48.9	NA	NA	NA
Leland, MS ²	41.6	8.7	37.3 - 46.2	3.6
Loxley, AL ²	42.6	20.0	31.8 - 50.5	8.5
Bossier City, LA ²	42.3	11.2	36.7 - 47.9	4.7
Maricopa, AZ ²	47.4	9.7	40.7 - 50.7	4.6
Starkville, MS ¹	39.3	NA	NA	NA

NA = Not Analyzed

1. The % CV, range or standard deviation are not reported since there was only one plot.
2. The % CV, range and standard deviation for this site are from four replicate plots.

Tableau 15 Concentrations en protéine Cry2Ab2 dans les échantillons de plante entière de la lignée MON 15985, prélevés à différents endroits aux États-Unis durant la saison au champ 1998

Site	Cotton Event or Line	Mean Cry2Ab2 (µg/g fwt)	% CV	Range (µg/g fwt)	Standard Deviation
Leland, MS ¹	15985	8.89	14.8	7.27 - 10.5	1.31
	DP50B	<1.24	NA ²	<1.24	NA ²
	DP50	<1.24	NA ²	<1.24	NA ²
Loxley, AL ¹	15985	8.72	14.5	7.31 - 9.87	1.27
	DP50B	<1.24	NA ²	<1.24	NA ²
	DP50	<1.24	NA ²	<1.24	NA ²

1. The % CV, range and standard deviation for this site are from four replicate plots.
2. The % CV or standard deviation is not reported since levels were below the limit of detection.

Les concentrations en protéine Cry2Ab2 dans les jeunes feuilles se sont avérées uniformes dans toutes les parcelles et tous les sites d'essais; ces concentrations ont varié de 10,1 à 33,3 µg/g (poids frais), la moyenne pour l'ensemble des sites s'établissant à 23,8 ± 6,3 µg/g (poids frais) (Tableau 11). Le Tableau 12 présente un résumé des concentrations moyennes en protéine Cry2Ab2 et des fourchettes des valeurs mesurées dans les tissus foliaires, à chaque endroit. La concentration moyenne en protéine Cry2Ab2 dans les échantillons foliaires a atteint un sommet 55 jours après les semis, puis elle a diminué durant le reste de la saison de croissance pour s'établir en moyenne à 16,7 µg/g (poids frais), 108 jours après les semis (Tableau 13). Aucune protéine Cry2Ab2 n'a été détectée dans les échantillons foliaires prélevés de la lignée témoin (DP50B) ou du témoin non transgénique (DP50), à quelque endroit (limite de dosage = 2,5 µg/g de poids frais).

De même, dans les graines de coton, les concentrations en protéine Cry2Ab2 se sont avérées uniformes à tous les endroits, variant de 31,8 à 50,7 µg/g (poids frais) pour une moyenne de 43,2 ± 5,7 µg/g (poids frais) (Tableau 11). Aucune protéine Cry2Ab2 n'a été détectée dans les échantillons de coton-graine prélevés de la lignée témoin (DP50B) ou du témoin non transgénique DP50. Le Tableau 14 résume les concentrations moyennes en protéine Cry2Ab2, ainsi que les fourchettes de valeurs qui ont été mesurées dans les graines de coton prélevées à huit endroits.

Dans les échantillons de plante entière, la concentration moyenne en protéine Cry2Ab2 a été de 8,80 ± 1,20 µg/g de poids frais, la fourchette des taux mesurés selon les endroits variant de 7,28 à 10,45 µg/g de poids frais (Tableau 11). Aucune protéine Cry2Ab2 n'a

été détectée dans les échantillons de plante entière de la lignée témoin (DP50B) ou de la lignée témoin non transgénique (DP50). Le Tableau 15 présente les concentrations moyennes en protéine Cry2Ab2 et les fourchettes de valeurs dans les tissus de la plante entière mesurées à deux endroits.

Enfin, aucune protéine Cry2Ab2 n'a été détectée dans le pollen dans une concentration supérieure à la limite de détection du dosage (0,25 µg/g de poids frais), et ce quels que soient l'endroit ou la lignée.

Production de la protéine GUS. Les concentrations en protéine GUS ont été mesurées dans les nouvelles feuilles et les graines de coton par un test ELISA validé. Dans la lignée MON 15985, la protéine GUS a été détectée en faibles concentrations dans ces tissus (Tableau 11, Tableau 16-17).

Tableau 16 Concentrations en protéine GUS dans les échantillons de feuilles de la lignée MON 15985 prélevés à différents endroits aux États-Unis, durant la saison au champ 1998

Site	Mean GUS (µg/g fwt)	% CV	Range (µg/g fwt)	Standard Deviation
Winnsboro, LA ¹	92.1	NA	NA	NA
Florence, SC ¹	101	NA	NA	NA
Corpus Christi, TX ¹	176	NA	NA	NA
Leland, MS ²	119	12.3	101 - 135	15
Loxley, AL ³	61.4	13.8	51.7 - 67.1	8.5
Bossier City, LA ²	100	19.2	79.5 - 126	19
Maricopa, AZ ²	103	10.5	92.0 - 116	11
Starkville, MS ¹	168	NA	NA	NA

NA = Not Analyzed

1. The % CV, range or standard deviation are not reported since there was only one plot from this site.
2. The % CV, range and standard deviation for this site are from four replicate plots.
3. The % CV, range and standard deviation for this site are from three replicate plots.

Tableau 17 Concentrations en protéine GUS dans les échantillons de coton graine de la lignée MON 15985, prélevés à différents endroits aux États-Unis durant la saison au champ 1998

Site	Mean GUS (µg/g fwt)	% CV	Range (µg/g fwt)	Standard Deviation
Winnsboro, LA ¹	50.6	NA	NA	NA
Florence, SC ¹	46.5	NA	NA	NA
Corpus Christi, TX ¹	71.3	NA	NA	NA
Leland, MS ²	64.6	13.8	58.0 - 77.7	8.9
Loxley, AL ²	51.8	19.8	37.2 - 60.6	10.3
Bossier City, LA ²	54.5	23.7	44.2 - 73.4	12.9
Maricopa, AZ ²	71.0	16.2	59.2 - 82.3	11.5
Starkville, MS ¹	39.6	NA	NA	NA

NA = Not Analyzed

1. The % CV, range or standard deviation are not reported since there was only one plot from this site.
2. The % CV, range and standard deviation for this site are from four replicate plots.
3. The % CV, range and standard deviation for this site are from three replicate plots.

Le Tableau 16 résume les concentrations moyennes en protéine GUS et les fourchettes de valeurs mesurées dans les tissus foliaires. Les concentrations en protéine GUS dans les jeunes feuilles ont varié de 51,7 à 176 µg/g de poids frais, la moyenne pour l'ensemble des sites d'échantillonnage s'établissant à 106 ± 32 µg/g de poids frais (Tableau 11). Aucune protéine GUS n'a été détectée dans les échantillons de feuilles provenant de la lignée témoin (DP50B) ou de la lignée non transgénique témoin (DP50), à aucun endroit.

Le Tableau 17 résume les concentrations moyennes en protéine GUS et les fourchettes de valeurs mesurées dans les graines de coton, à chacun des sites d'échantillonnage. Les concentrations en protéine GUS dans les graines de coton ont varié de 37,2 à 82,3 µg/g de poids frais, la moyenne étant de $58,8 \pm 13,0$ µg/g de poids frais (Tableau 11). Aucune protéine GUS n'a été détectée dans les échantillons de graines de la lignée témoin (DP50B) ou de la lignée non transgénique témoin (DP50).

Enfin, dans tous les tissus échantillonnés des lignées témoins DP50 et DP50B, les concentrations en protéines Cry2Ab2 et GUS se sont avérées inférieures au seuil de détection. Quant à lignée MON 15985, les concentrations de protéines Cry2Ab2 et GUS dans les tissus sont faibles, comparativement à la teneur totale en protéines; la protéine Cry2Ab2 ne représente en effet que 0,014 % de la teneur totale en protéines dans les feuilles, et cette proportion est de 0,072 % pour la protéine GUS.

Concentrations en protéines Cry1Ac, NPTII et AAD dans la lignée MON 531. Les concentrations en protéines Cry1Ac, NPTII et AAD ont été analysées dans la lignée MON 531 – plante-mère de la lignée MON 15985. Ces analyses n'ont pas été répétées pour la lignée MON 15985, mais les données qui ont été présentées pour l'évaluation de la lignée MON 531 sont résumées ci-après. Selon l'analyse de la lignée MON 531, les protéines Cry1Ac et NPTII ont été exprimées de façon constitutive, en faibles concentrations dans les feuilles, les racines, les fleurs, le pollen et les graines, les taux diminuant à partir du 46^e jour après les semis. La concentration moyenne en protéine Cry1Ac dans les graines de coton brutes, recueillies dans le cadre d'essais menés sur huit ans à de multiples endroits, a varié d'environ 1 à 9 µg/g (poids frais). Durant la même période, la concentration moyenne en protéine NPTII a varié de 2,0 à 15 µg/g (poids frais) dans les graines de coton brutes.

Les concentrations moyennes en protéine Cry1Ac, déterminées à partir du matériel cultivé au champ en 1992, ont été de 1,56 et 0,86 µg/g (poids frais), respectivement dans les feuilles et les graines de coton brutes, les concentrations moyennes en protéine NPTII dans les mêmes tissus s'établissant respectivement à 3,15 et 2,45 µg/g (poids frais). La protéine Cry1Ac n'a pas été détectée dans le nectar de la lignée MON 531 durant un dosage dont la limite de détection était de 1,6 ng/g (poids frais de nectar). La présence de la protéine Cry1Ac a été décelée dans le pollen en des concentrations à peine supérieures à la limite de détection du dosage, soit 11,5 ng/g de poids frais du pollen.

La concentration moyenne en Cry1Ac dans les structures de fructification de la lignée primaire MON 531 a été de 259 µg/g (poids sec), 46 jours après les semis, le taux diminuant par la suite de façon exponentielle pour atteindre 43 µg/g, 116 jours après les semis. L'expression de la protéine dans les feuilles terminales est passée de 370 mg/g de poids sec (46 jours après les semis) à 144 mg/g après 116 jours. Les concentrations de protéine Cry1Ac sont toutefois demeurées assez élevées pour assurer un contrôle efficace des insectes ravageurs ciblées durant toute la saison.

À maturité, les plants de la lignée MON 531 contenaient environ 0,08 µg de protéine Cry1Ac/g (poids frais) et 3,3 µg de protéine NPTII/g (poids frais), d'après les analyses de la plante entière, ce qui équivaut à peu près à 10 µg de protéine Cry1Ac par plant. Après la transformation, les concentrations en protéine Cry1Ac avaient diminué à des seuils non

détectables dans les principaux produits dérivés des graines de coton, dont l'huile raffinée, la pâte brune de linters et le tourteau de graines de coton.

La protéine AAD n'a pas été détectée dans les tissus de feuilles ou de graines de la lignée MON 531 aux seuils de détection de 0,008 et 0,005 µg/g (poids frais) respectivement. Ce résultat n'a toutefois rien d'inhabituel, puisque le gène *aad* est régulé par un promoteur bactérien et qu'on ne s'attend pas à ce qu'il soit exprimé dans le coton.

9.B-2 Études sur les équivalents protéiques

Le demandeur doit étudier les propriétés physiques et biochimiques des protéines nouvelles qui sont élaborées par les gènes introduits dans la plante transgénique. Cependant, comme le taux de production de protéines est souvent faible dans les plantes transgéniques, le demandeur doit faire ces études sur des protéines obtenues par fermentation bactérienne, cette technique étant le seul moyen pratique d'obtenir suffisamment de protéines pour les études. Lorsqu'il y a lieu, il est important que le demandeur fournisse des données qui confirment l'équivalence des protéines bactériennes et végétales, afin qu'il soit possible de tirer des conclusions sur la plante transgénique par extrapolation à partir des données expérimentales. Ces données peuvent aussi être utiles pour établir des comparaisons entre la plante transgénique et ses contreparties classiques ou les lignées parentales, comparaisons qui aident ensuite à déterminer les changements dans le rendement des végétaux qui pourraient être attribuables à l'introduction des gènes nouveaux ou aux produits qui en sont dérivés. Ces données, utiles pour évaluer les risques pour l'environnement et la salubrité de la plante transgénique comme culture vivrière et fourragère, sont donc examinées par les spécialistes chargés d'évaluer à la fois les risques pour l'environnement et l'innocuité du produit pour l'alimentation humaine et animale.

En raison des très faibles concentrations de protéine Cry2Ab2 dans les tissus de la lignée MON 15985, il a fallu produire la protéine Cry2Ab purifiée par fermentation bactérienne. Cette protéine purifiée a été utilisée pour les études de caractérisation et les tests d'écotoxicité. La protéine Cry2Ab d'origine bactérienne a ensuite été comparée à la protéine Cry2Ab2 élaborée par la lignée MON 15985, pour s'assurer que les résultats sur l'une pourraient s'appliquer à l'autre, par extrapolation, avec un niveau de certitude scientifique acceptable.

Détermination de la taille. Des solutions de protéine bactérienne Cry2Ab ont été appliquées sur un gel de polyacrylamide (4 à > 20 %) en conditions réductrices. Des marqueurs de poids moléculaire ont été utilisés pour déterminer le poids des protéines Cry2Ab bactérienne et des protéines contaminantes. Le rapport entre les protéines Cry2Ab bactériennes et les protéines contaminantes a été déterminé par analyse densitométrique et le poids moléculaire des protéines a été estimé en établissant des comparaisons avec les protéines marqueurs (données non présentées). La protéine Cry2Ab d'origine bactérienne avait le poids moléculaire prévu (63 kDa), avec un taux de pureté de 65,5 %.

Immunoréactivité. Les immunotransferts ont été préparés et élaborés séparément, en utilisant soit l'anticorps polyclonal de lapin anti-Cry2Ab, soit l'anticorps monoclonal de souris anti-Cry2Aa. Une protéine importante (~63 kDa) a été reconnue par les deux anticorps (anticorps polyclonal anti-Cry2Ab et anticorps monoclonal anti-Cry2Aa). Une

autre protéine immunoréactive (~53 kDa) a été observée; il s'agit fort probablement d'un produit de dégradation de la protéine de 63 kDa.

Bioactivité. La CE_{50} (concentration efficace moyenne) et la CL_{50} (concentration létale causant la mort de la moitié des organismes d'essais) de la protéine bactérienne Cry2Ab ont été déterminées à l'aide de l'insecte ravageur *Helicoverpa zea*.

Séquence d'acides aminés en N terminal. Il a été déterminé que la séquence en N terminal du principal polypeptide dans l'échantillon de la protéine bactérienne Cry2Ab coïncidait dans une large mesure avec la séquence prévue. Un N terminal « décalé » a permis d'identifier une séquence mineure et majeure, un résultat qui pourrait avoir été causé par les sites sensibles aux protéases qui se trouvent dans la portion N terminale de la protéine. De plus, la cystéine en position 13 n'a été observée dans aucune des séquences déterminées, ce qui est conforme avec la dégradation d'Edman employée avec laquelle les résidus de cystéine sont chimiquement instables.

Stabilité. La stabilité de la protéine bactérienne Cry2Ab dans l'eau purifiée a été déterminée à des températures d'entreposage de 4, -20 et -80 °C, durant une période de 87 jours. Des aliquotes ont été prélevées à 0, 11, 41, 52 et 87 jours et analysées par électrophorèse de polyacrylamide en présence de sulfate de sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE) (données non fournies). Une analyse densitométrique a aussi été faite des gels de SDS-PAGE (données non fournies). Sur ces gels, la protéine est demeurée stable pendant au moins 87 jours, à des températures d'entreposage de -80, -20 et 4 °C dans l'eau purifiée. Seuls les échantillons entreposés à 4 °C ont présenté une faible diminution de la densité optique et ceux conservés à -80 et -20 °C n'ont pas montré de dégradation significative.

Les résultats de la caractérisation de la protéine Cry2Ab d'origine bactérienne sont résumés au Tableau 18.

Tableau 18 Résumé des caractéristiques de la protéine Cry2Ab

Criteria	Method	Result
Identity and molecular weight	a) N-terminal sequence analysis b) Immunoblot	a) confirmed b) confirmed
Concentration	Protein assay and amino acids compositional analysis	correction factor of 1.7 was established
Strength	CEW bioassay (corrected for purity and amino acid compositional analysis)	EC_{50} of 0.24 g/ml LC_{50} of 52.4 g/ml
Purity	Densitometry	65.5%
Stability	SDS-PAGE and immunoblot analysis of solutions stored at 4, -20 and -80°C	≥87 days at -20 and -80°C; at least 52 days at 4°C
Heat stability	SDS-PAGE/Western Blot analysis of samples	no bands seen after treatment at 121°C for 30 mins

Ces données confirment que les caractéristiques de la protéine Cry2Ab obtenue par fermentation bactérienne sont équivalentes à celles de la protéine élaborée par les

végétaux et donc que les études sur la protéine bactérienne peuvent servir à étudier l'innocuité de la protéine végétale.

Caractérisation de la protéine Cry1Ac. Des données sur l'analyse de la protéine Cry1Ac ont été soumises par le promoteur du projet pour l'homologation de la lignée MON 531. Ces données indiquent que la delta-endotoxine Cry1Ac d'origine bactérienne, exprimée et purifiée, se compare suffisamment à celle exprimée dans le végétal pour être utilisée dans les études toxicologiques sur les mammifères. Les delta-endotoxines Cry1Ac d'origines végétale et bactérienne ont un poids moléculaire et une immunoréactivité similaires (SDS-PAGE et transfert Western), ne présentent aucune modification post-traductionnelle détectable (essais de glycosylation), ont des séquences d'acides aminés identiques en N terminal et ont produit des résultats similaires aux essais biologiques dirigés contre *Heliothis virescens* et *Helicoverpa zea*. Bien qu'on puisse difficilement prouver que les deux protéines sont identiques, les résultats combinés de ces études montrent qu'il est très probable que ces deux sources produisent des protéines essentiellement identiques.

Caractérisation et antécédents d'utilisation sans risque des protéines Cry2Ab2 et Cry1Ac. Les longs antécédents d'utilisation sans danger de produits bactériens homologués à base de *B. thuringiensis* attestent de l'innocuité des protéines Cry (U.S. EPA, 1998; IPCS, 1999). Des souches de *B. thuringiensis* sont en effet utilisées en toute sécurité depuis plus de 40 ans comme pesticides microbiens commerciaux et il a été démontré que les protéines Cry produites naturellement par *B. thuringiensis* n'ont pas d'effets nocifs sur le poisson, les espèces aviaires, les mammifères et d'autres organismes non ciblés (US EPA, 1988; Betz *et al.*, 2000). L'innocuité des protéines Cry pour les espèces non ciblées s'explique par leur mode d'action hautement spécifique et leur digestibilité rapide. L'EPA et l'OMS ont conclu que l'exposition alimentaire aux protéines Cry, qui pourrait résulter des pulvérisations microbiennes sur des cultures vivrières, ne pose aucune inquiétude : "Les profils d'utilisation de *B. thuringiensis* pourraient causer une exposition par voie alimentaire, en raison de la présence possible de résidus de spores bactériennes sur les produits agricoles frais. Cependant, vu l'absence de préoccupations toxicologiques, on ne s'attend pas à ce que la consommation des produits traités pose des risques pour la population en général ou pour les enfants et les nourrissons" [traduction] (U.S. EPA, 1998) et "la présence de Bt dans l'eau potable ou les aliments n'a été associée à aucun effet indésirable sur la santé humaine" [traduction] (IPCS, 1999).

La séquence d'acides aminés de la protéine Cry2Ab2 élaborée dans la lignée MON 15985 a été prévue à partir de la séquence nucléotidique codante. Les acides aminés de la protéine Cry2Aa ont présenté un haut degré de similarité (97 %; 88 % d'acides aminés identiques) avec ceux de la protéine Cry2Ab2 exprimée dans la lignée MON 15985. Les études de sécurité réalisées sur les produits microbiens issus de *B. thuringiensis* et contenant les protéines Cry2A ont donc été jugées pertinentes pour évaluer la sécurité de la protéine Cry2Ab dans la lignée MON 15985. Or il a été démontré que la protéine Cry2A présente dans les produits microbiens de *B. thuringiensis* n'a pas d'effets nocifs sur le poisson, les espèces aviaires, les mammifères et d'autres organismes non visés (US EPA, 1998; Betz *et al.*, 2000).

Pour les épreuves d'innocuité, la protéine Cry1Ac a été produite sous forme de cristal insoluble dans *B. thuringiensis*, la protéine cristalline étant la protoxine de la protéine. La séquence d'acides aminés de la protéine Cry1Ac exprimée dans la lignée MON 531 a été prévue à partir de l'analyse des nucléotides codants. La protéine Cry1Ac élaborée dans la lignée de coton MON 531 s'est révélée identique – dans une proportion de plus de 99,4 % – à celle produite par la souche bactérienne de *B. thuringiensis*.

Pour que la protéine Cry1Ac exerce son activité insecticide, elle doit être ingérée. Dans l'intestin de l'insecte, la protéine est solubilisée sous l'action du pH élevé de l'intestin et fait l'objet d'un clivage protéolytique jusqu'à la portion nucléaire active de la protéine qui résiste à toute autre dégradation par les protéases intestinales. La protéine nucléaire se lie à des récepteurs spécifiques dans l'intestin moyen des lépidoptères où elle pénètre à l'intérieur de la membrane et forme des pores spécifiques aux ions (English et Slatin, 1992). Ces processus perturbent la digestion et provoquent la mort de l'insecte. L'absence de toxicité aiguë de la protéine Cry pour les espèces non visées s'explique par son mode d'action hautement spécifique et sa digestibilité rapide.

Caractérisation et antécédents d'utilisation sans danger de la protéine NPTII. La protéine NPTII exprimée dans la lignée MON 531 se compare, sur les plans chimique et fonctionnel, à la protéine NPTII présente à l'état naturel (Fuchs *et al.*, 1993). Le gène codant a été intégré dans un certain nombre de cultures transgéniques et les produits qui en sont issus sont consommés sans danger depuis dix ans.

Caractérisation et antécédents d'utilisation sans danger de la protéine GUS. La protéine GUS élaborée dans la lignée MON 15985 a de longs antécédents d'utilisation sans danger. Les humains sont souvent exposés à cette protéine, qui est présente dans les cellules épithéliales de l'intestin, les bactéries de la microflore intestinale et de nombreux aliments, et aucun effet nocif n'a été rapporté (Gilissen *et al.*, 1998). L'activité de la protéine GUS a également été observée dans plus de 50 espèces végétales (Hu *et al.*, 1990), dont un certain nombre utilisées pour l'alimentation humaine comme la pomme de terre, la pomme, les amandes, le seigle, la rhubarbe et la betterave à sucre (Schulz et Weissenbock, 1987; Hodal *et al.*, 1992; Wozniak et Owens, 1994). La protéine GUS est aussi présente dans le bœuf et dans un certain nombre d'espèces invertébrées, incluant des nématodes, des mollusques, des escargots et des insectes (Gilissen *et al.*, 1998). Même lorsqu'elle est ingérée dans des aliments crus comme des mollusques ou des pommes, la protéine GUS n'a été associée à aucun effet nocif (Gilissen *et al.*, 1998). De même, les métabolites de la protéine GUS dérivée d'*E. coli* sont non toxiques (Gilissen *et al.*, 1998). L'enzyme GUS dérivée d'*E. coli* produite par la lignée MON 15985 correspond, dans une proportion de 99,8 %, à l'enzyme GUS d'*E. coli* naturellement présente dans l'intestin humain et elle lui est équivalente sur le plan fonctionnel (données non fournies).

Ces données témoignent des antécédents d'utilisation et de consommation sans danger de toutes les protéines nouvelles exprimées dans la lignée MON 15985, lesquelles ne devraient donc pas avoir d'effets défavorables si la ligne de coton est cultivée, transformée et consommée.

Digestion dans des liquides gastrique et intestinal simulés. Les protéines rapidement digérées présentent un risque minimal de conférer une toxicité ou une allergie nouvelle,

lequel se compare au risque associé à d'autres protéines alimentaires sans danger (Astwood *et al.*, 1996; Astwood et Fuchs, 2000). Le taux de dégradation des protéines a été évalué séparément dans des liquides gastrique (pepsine, pH = 1,2) et intestinal (pancréatine, pH = 7,5) simulés. La méthode utilisée pour la préparation des solutions de digestion simulées est décrite dans la pharmacopée des États-Unis (1995). Dans le cas des protéines Cry1Ac et NPTII, l'absence d'effets toxiques chez les humains et d'autres mammifères a été corroborée par les données présentées pour l'homologation de la lignée MON 5311, indiquant une dégradation rapide de ces protéines dans les études sur la digestion gastrique.

Dans le cadre d'études *in vitro*, des mélanges de liquides gastrique et intestinal simulés de mammifères ont été utilisés pour évaluer la sensibilité de la protéine Cry2Ab2 à la digestion protéolytique. Le taux de dégradation de la protéine Cry2Ab2 a été évalué séparément, en utilisant des liquides gastrique (pepsine, pH = 1,2) et intestinal (pancréatine, pH = 7,5) simulés. La méthode utilisée pour la préparation des solutions de digestion simulées est décrite dans la pharmacopée des États-Unis (1995).

La dégradation de la protéine Cry2Ab2 a été évaluée par SDS-PAGE, transfert Western et dosage biologique des insectes. L'analyse par SDS-PAGE du liquide gastrique simulé (LGS) a révélé que plus de 98 % de la protéine Cry2Ab2 avait été digérée en moins de 15 secondes, sans aucun fragment de plus de 2 kDa de la protéine d'origine. Les conditions acides à l'intérieur de l'estomac dénaturent la conformation native de la protéine Cry2Ab2, ce qui en favorise une digestion rapide. L'analyse par transfert Western du liquide intestinal simulé (LIS) a révélé que la protéine Cry2Ab2 a été dégradée en moins d'une minute, en un fragment protéique relativement stable (≈ 50 kDa), bioactif pendant au moins 24 heures. Ce résultat n'a rien d'étonnant, car il a été démontré que les protéines nucléaires résistantes aux protéases issues des protéines insecticides de *B. thuringiensis* résistent à la digestion par la trypsine (Lilley *et al.*, 1980). *In vivo*, la protéine Cry2Ab2 serait exposée aux conditions gastriques avant de pénétrer dans le lumen intestinal. Le faible pH de l'estomac et la présence de pepsine auraient pour effet de digérer entièrement la protéine ou de la rendre sensible à la digestion intestinale.

In vitro, des mélanges de liquides gastrique et intestinal simulés de mammifères ont été utilisés pour évaluer la sensibilité de la protéine GUS à la digestion protéolytique. Le taux de dégradation de la protéine a été évalué séparément, dans les liquides gastrique (pepsine, pH = 1,2) et intestinal (pancréatine, pH = 7,5) simulés.

La dégradation de la protéine GUS a été évaluée par transfert Western et dosages de l'activité enzymatique. Après moins de 15 secondes d'exposition au liquide gastrique simulé, aucune protéine GUS n'était détectable avec l'un ou l'autre test. Après deux heures d'exposition au liquide intestinal simulé, la protéine GUS d'origine avait perdu 91 % de son activité dans le dosage, et seule une faible bande a été obtenue avec le transfert Western. À la lumière de ces résultats, il a été conclu que toute protéine GUS qui serait ingérée par les humains serait rapidement dégradée dans le tube digestif (Fuchs et Astwood, 1996).

Les protéines Cry2Ab2, Cry1Ac, NPTII et GUS se dégradent toutes rapidement dans les liquides gastriques simulés, ce qui signifie qu'elles seront rapidement dégradées dans

l'estomac de mammifères et qu'il est donc peu probable qu'elles aient un effet toxique sur les mammifères. La digestion des protéines NPTII et GUS dans les liquides intestinaux est elle aussi rapide; en revanche, la dégradation des protéines Cry2Ab2 et Cry1Ac a été moindre et celles-ci sont demeurées plus stables dans ces liquides. Ces résultats, compatibles avec la stabilité des protéines nucléaires de Bt aux protéases, indiquent néanmoins qu'il est peu probable que ces protéines soient toxiques pour les mammifères, car elles seraient exposées à une dégradation initiale dans les liquides gastriques avant d'atteindre l'intestin et que les intestins des mammifères n'ont pas de récepteurs sur lesquels pourraient se fixer les protéines nucléaires de Bt. L'évaluation de l'innocuité des protéines présentes dans la lignée MON 15985 fait état de caractéristiques attestant d'un haut niveau de sécurité pour les consommateurs.

9.C CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE

Les phytogénéticiens se basent sur la croissance, la morphologie, le rendement et d'autres caractéristiques agronomiques pour déterminer les changements génétiques involontaires et indésirables qui pourraient se manifester dans de futurs produits. À cette fin, la croissance et le rendement des lignées transgéniques dans des milieux représentatifs à ceux de variétés acceptables connues. Les effets résultat de l'insertion de gènes nouveaux sur les caractéristiques phénotypiques de la lignée MON 15985 ont été évalués, en recueillant des données agronomiques durant les essais au champ. La présente section compare le comportement agronomique de la plante transgénique à celui de lignées de coton étroitement apparentées et de la lignée parentale – le coton transgénique MON 531. Des données et des éléments d'information précis sont présentés sous formes descriptive et tabulaire.

Aux États-Unis, des essais au champ sur la lignée MON 15985 ont été réalisés à huit endroits en 1998, puis à 90 endroits en 1999 et 87 endroits en 2000. Les évaluations qualitatives et quantitatives du comportement agronomique ont été faites en collaboration avec des universitaires et des conseillers en culture, ainsi que dans le cadre d'essais de variétés dans les États concernés. Dans la plupart des cas, il s'agissait d'essais en blocs aléatoires complets formés de quatre rangés de 30 à 60 pi de longueur. Un suivi détaillé des caractéristiques de croissance et de développement et de l'incidence des maladies dans la lignée MON 15985, par rapport aux plants témoins de coton, a été fait au moins une fois par mois, durant la saison de croissance.

9.C-1 Caractéristiques agronomiques et morphologiques

Durant les essais au champ, des conditions météorologiques caractéristiques des régions de culture ont été observées, à l'exception d'un ouragan qui a frappé un État en 1998 et qui a produit des pluies et des vents plus élevés qu'à la normale.

Chaque année, les critères agronomiques ont été mesurés à de multiples endroits, dans les quinze principaux États producteurs, pour assurer l'équivalence avec le cultivar parent. Ces critères incluaient le rendement, la morphologie et la maturité, la sensibilité aux ravageurs et aux maladies ainsi que la qualité de la fibre. Le rendement, la morphologie et la maturité ont été évalués à partir d'un certain nombre d'observations variées, couramment utilisées pour l'évaluation du coton dans le cadre des programmes de sélection, tandis que la qualité de la fibre a été évaluée à l'aide de la chaîne de classement

automatique (HVI) qui permet notamment de mesurer la longueur, la résistance et le micronaire de la fibre (données non fournies). Les données agronomiques recueillies durant les essais ont été publiées (Mahaffey, *et al.*, 2000)

Type de développement. Plusieurs critères ont été mesurés pour déterminer la morphologie et la maturité, à savoir l'aspect général de la plante, le nombre de jours avant la levée, la vigueur à la levée, le nombre de plants par peuplement, le rapport hauteur/nœuds, le nombre de jours avant l'apparition de la première fleur blanche, le nombre de jours avant l'ouverture de la première capsule, le nombre de jours avant l'ouverture de 50 % des capsules, la rétention des fruits, la cartographie des végétaux et la précocité de récolte.

Aucune différence significative dans le type de développement n'a été observée entre la lignée MON 15985 et les deux lignées témoins, soit les lignées DP50 (coton classique) et DP50B (lignée parentale MON 531).

Durée de vie. Les observations sur la lignée MON 15985, recueillies durant quatre années d'essais au champ réalisés à huit endroits différents, confirment que cette lignée de coton a la même durée de vie que la lignée classique.

Vigueur végétative. Des données sommaires sur la moyenne du rapport hauteur/nœuds, du nombre de jours avant la floraison maximale et du nombre total de capsules ouvertes sont présentées au Tableau 19.

Tableau 19 Résumé de la moyenne du rapport hauteur/nœuds, du nombre de jours avant la floraison maximale et du nombre total de capsules ouvertes à huit endroits des États-Unis, en 1998

Event or line #	Height:node ratio	Mean number of days to peak bloom	Mean total number of cracked bolls/plot
MON 15985	1.70	15.29	407
DP50B	1.77	15.03	431
DP50	1.72	15.77	284

Aucune différence significative n'a été observée entre la vigueur végétative des lignées MON 15985, DP50B (MON 531) et DP50, ce qui signifie que la croissance végétative du coton transgénique se compare à celle des variétés classiques de coton.

Reproduction. Les observations détaillées recueillies par les coopérateurs sur le terrain durant les essais au champ réalisés à de multiples endroits des États-Unis en 1998, 1999 et 2000 confirment que le mode et le taux de reproduction de la lignée MON 15985 sont caractéristiques de ceux des autres variétés de coton.

Rendement. Aucune différence statistique n'a été observée entre les lignées MON 15985, DP50 et DP50B, en ce qui a trait au pourcentage de fibres (masse de fibres en pourcentage de la somme des fibres et des semences), à l'indice des semences (masse en grammes de 100 graines) ou à la taille des capsules (Figures 14 et 15) (Mahaffey, *et al.*, 2000).

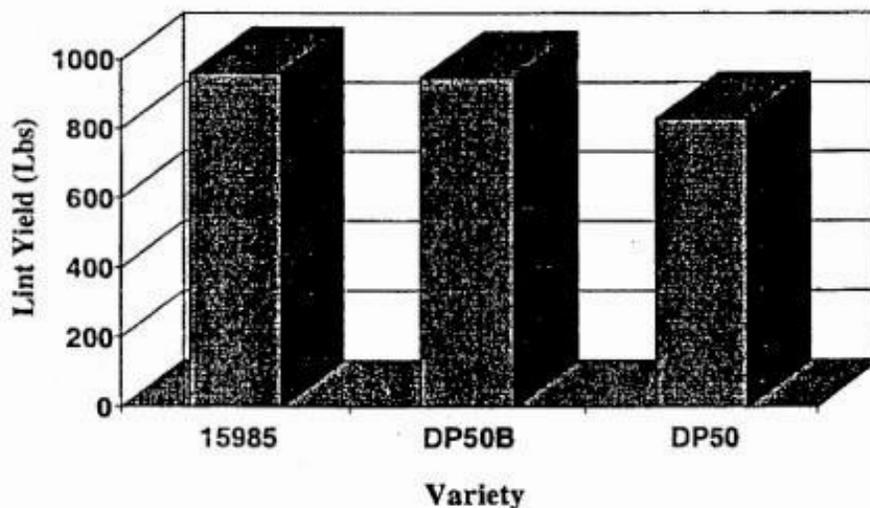


Figure 14 Production moyenne de fibres (en livres par acre) pour l'ensemble des endroits où des essais au champ ont été menés en 1998 et 1999.

Notes for figure: 15985 = MON 15985; DP50B = MON 531; DP50 = conventional cotton

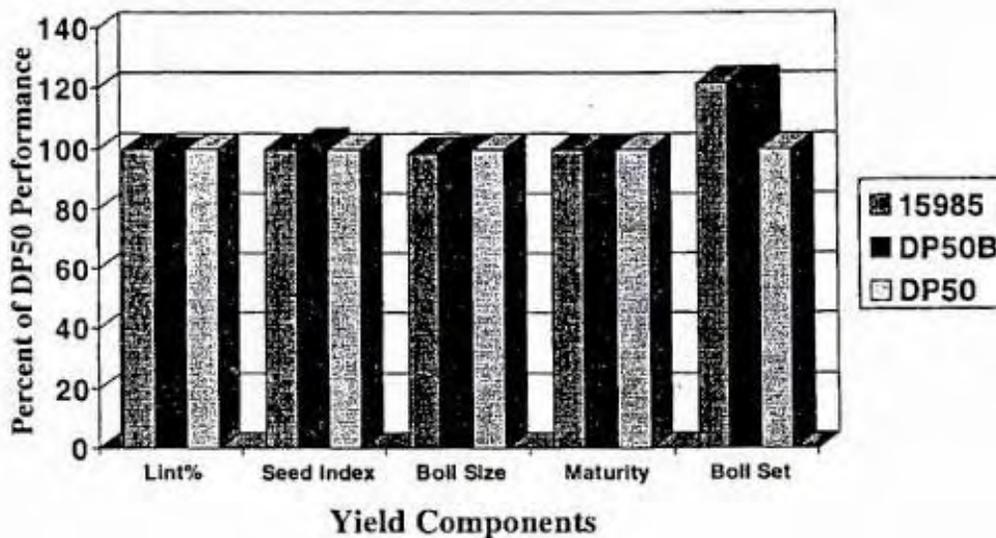


Figure 15 Caractéristiques du rendement en pourcentage du rendement de la lignée DP50 durant les essais au champ en 1998 et 1999.

Notes for figure: 15985 = MON 15985; DP50B = MON 531; DP50 = conventional cotton

Sensibilité aux ravageurs et aux maladies. À chaque lieu d'essai, les symptômes de maladies ont été évalués une fois par mois durant la saison de croissance. Les parcelles ont fait l'objet d'une inspection visuelle visant à déceler des symptômes possibles de maladie, par exemple la fonte des semis, la pourriture des capsules, la tache des feuilles,

la nécrose des feuilles, la présence de plantes rabougries ou déformées ou le flétrissement. Ces symptômes indiquent la présence locale de maladies du coton.

La fréquence de surveillance des infestations par les insectes et des symptômes de maladies a été accrue à une surveillance hebdomadaire, dès l'apparition d'infestations par des larves de lépidoptères. Ces observations ont été faites selon les protocoles habituels et les rapports des essais au champ ont été joints à la demande (300 pages, non inclus ici).

L'évaluation des dommages a été faite en fonction à la fois des infestations naturelles et artificielles et a été basée sur l'inspection de dix plantes choisies au hasard dans la rangée centrale (20 plantes par site) de chaque parcelle d'essai, durant les périodes d'infestation précises dans les parcelles témoins des variétés classiques (DP50). Les données recueillies pour l'évaluation des dommages ont porté sur certains ou la totalité des éléments suivants :

- œufs ou masses d'œufs;
- nombre de légionnaires de la betterave (*Spodoptera exigua*) découverts;
- larves vivantes identifiées par espèce et emplacement sur la plante;
- feuilles terminales endommagées et espèce soupçonnée de causer ces dommages;
- pourcentage (%) estimatif de défoliation et espèce soupçonnée de causer ces dommages;
- bourgeons floraux endommagés et espèce soupçonnée de causer ces dommages;
- efflorescences blanches endommagées et espèce soupçonnée de causer ces dommages;
- capsules endommagées et espèce soupçonnée de causer ces dommages.

Des symptômes de maladie ont été documentés dans environ 13 % des endroits, mais aucune différence n'a été observée entre la lignée MON 15985 et les variétés classiques témoins de coton, quant à l'incidence et à la gravité de ces symptômes.

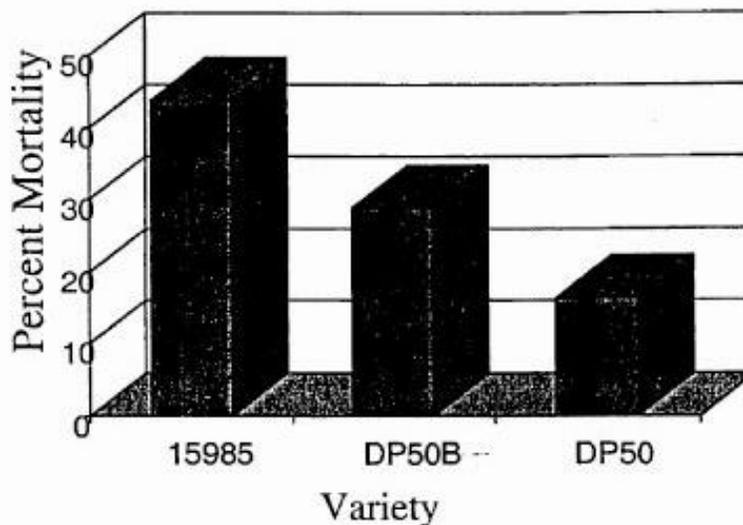
Sur la base des nombreuses observations sur le terrain recueillies dans le cadre de plus de 250 essais au champ réalisés aux États-Unis de 1998 à 2000, il a été établi que la lignée MON 15985 présente des caractères agronomiques et morphologiques comparables à ceux des variétés classiques de coton. Le développement, le comportement agronomique et la morphologie de la lignée MON 15985 indiquent en effet que celle-ci se compare aux variétés classiques de coton sur le plan de la croissance et de son rendement agronomique, qu'elle est bien adaptée à la production de coton et qu'elle ne présente aucun caractère jugé indésirable à cette fin. Ces données viennent donc appuyer la conclusion selon laquelle l'insertion des gènes n'a pour seul effet que d'améliorer la protection contre les insectes.

9.C-2 Efficacité

L'efficacité des protéines Cry exprimées dans la lignée MON 15985 a été évaluée durant les essais au champ ayant servi à évaluer le rendement agronomique (section 9.C.1). Les insectes ont été observés tout au long des essais, et des évaluations qualitatives ont été faites plus de 530 fois durant les deux premières années des essais. Dans environ 41 %

des lieux d'essais au champ, des différences dans le nombre d'insectes visés ont été documentées entre la lignée MON 15985 et les variétés classiques témoins de coton. Les données d'efficacité obtenues dans le cadre de ces études ont été publiées (Jackson *et al.*, 2000).

La Figure 16 illustre la mortalité du ver de la capsule du coton. Aux fins de cette étude, des tissus foliaires ont été prélevés d'au moins 100 plantes par traitement et ont été infestés par une ou deux petites larves, dans des contenants en laboratoire. La mortalité a été évaluée visuellement, 72 heures après l'infestation.



Dr. Roger Leonard, Louisiana State University

Figure 16 Pourcentage de mortalité du ver de la capsule du coton, 72 heures après l'infestation de tissus foliaires obtenus au champ.

Notes for figure: 15985 = MON 15985; DP50B = MON 531; DP50 = conventional cotton

Les gènes insérés ont amélioré la protection de la lignée MON 15985 contre les lépidoptères nuisibles. Les résultats des observations sur l'évaluation des dommages indiquent en effet clairement que la lignée MON 15985 est plus efficace contre les insectes ciblés (ver de la capsule du coton, noctuelle verdoyante et ver rose de la capsule du cotonnier) que la lignée MON 531 et le coton classique (DP50).

L'efficacité de la lignée MON 15985 contre les infestations d'insectes visés a ainsi été constamment supérieure à celle des variétés témoins. Ces résultats confirment que les produits des gènes *cry1Ac* et *cry2Ab* confèrent une protection efficace contre les lépidoptères nuisibles des cultures commerciales de coton.

10. CONSÉQUENCES DE L'INTRODUCTION DANS L'ENVIRONNEMENT

L'évaluation des interactions entre la lignée MON 19985 et l'environnement examine entre autres le transfert de gènes à d'autres végétaux (pollinisation croisée), le transfert de gènes à d'autres espèces de coton cultivées (introgression), le potentiel d'envahissement,

la germination et la dissémination des semences, les effets sur les organismes non visés et le risque que le végétal se comporte comme un organisme nuisible.

10.A CONSEQUENCES DU TRANSFERT POTENTIEL DE GENES A DES VEGETAUX APPARENTES

L'introggression de l'information génétique d'une plante à une autre est importante uniquement si les deux plantes sont sexuellement compatibles et si leurs descendants hybrides sont viables. Pour évaluer les risques environnementaux potentiels d'une pollinisation croisée de plantes transgéniques, il faut connaître la biologie de la reproduction du végétal et la répartition des parents sexuellement compatibles et comprendre l'impact du caractère introduit s'il venait à être introgressé dans d'autres espèces végétales. On peut trouver des éléments d'information dans les revues consacrées à la biologie des espèces végétales, les ouvrages scientifiques comportant des études de la flore nationale ou régionale, les publications des agrologues et des malherbologistes.

Une évaluation du risque doit toujours supposer que la plante transgénique étudiée est capable de pollinisation croisée avec des espèces sexuellement compatibles, à moins que l'expérience ait clairement prouvé le contraire (p. ex., la plante transgénique a été rendue infertile). La signification pour l'environnement de l'introggression du caractère varie avec chaque combinaison plante / caractère. Par exemple, le mouvement d'un caractère de tolérance à un herbicide (HT) provenant de *Brassica napus* (canola) vers un parent envahissant est considéré comme un risque environnemental faible puisque la tolérance à l'herbicide n'augmente pas la valeur adaptative des hybrides tolérant ou non l'herbicide, ou de leurs descendants, en l'absence de pression de sélection exercée par l'herbicide. En outre, l'apparition de tout hybride tolérant à un herbicide peut être gérée efficacement en faisant appel à des stratégies alternatives de lutte qui sont partie intégrante de la culture classique du canola. Inversement, l'introggression d'un gène de résistance aux insectes provenant d'un coton transgénique dans des populations sauvages de *Gossypium* pourrait en théorie accroître la valeur adaptative de ce dernier si l'insecte visé était responsable de la limitation de la taille de la population ou de la répartition des parents sauvages.

Pour que le flux génétique intervienne par le biais d'une transmission sexuelle normale, certaines conditions doivent être remplies :

- les deux parents doivent être sexuellement compatibles;
- leurs fécondités doivent coïncider;
- un vecteur approprié du pollen doit être présent et capable de transporter le pollen entre les deux parents;
- les descendants qui en résultent doivent être fertiles et s'adapter à l'environnement dans lequel ils évoluent de manière écologique.

Trois voies potentielles pouvant entraîner le transfert de gène ont été examinées, soit le matériel végétatif, les graines et le pollen. En général, la propagation du coton ne se fait pas par le matériel végétatif et, si cela devait survenir aux États-Unis, le coton risquerait peu de survivre aux conditions de gel durant l'hiver dans la plupart des régions de culture du coton. Quant aux capsules de coton, elles risquent peu d'être dispersées par des

mécanismes comme le vent, les oiseaux ou les animaux terrestres, en raison de leur taille et de leurs propriétés générales. Il ne reste donc que la dispersion du pollen comme principal facteur à considérer pour évaluer le flux génétique à partir de lignées transgéniques cultivées.

Pollinisation croisée avec des espèces sauvages de *Gossypium*. Le flux génétique à des espèces sauvages n'est possible que si le pollen trouve des espèces sexuellement compatibles. Dans le cas du coton cultivé, l'organisme récepteur doit être allotétraploïde et posséder le génome AADD. Or aux États-Unis, seules trois espèces de *Gossypium* pourraient servir de récepteurs pour *G. hirsutum*; il s'agit des espèces *G. hirsutum*, *G. barbadense* et *G. tomentosum*, cette dernière n'étant présente qu'à Hawaï. Par ailleurs, *G. barbadense* ne pousse pas à l'état sauvage aux États-Unis; cette espèce n'est cultivée qu'à partir de graines produites dans des champs producteurs de semences, qui sont isolés des champs de culture commerciale du coton. De plus, la récolte de cette espèce ne sert qu'à la transformation et n'est pas utilisée pour la reprise des semis. Le flux génétique vers des champs commerciaux de *G. barbadense* serait donc de courte durée.

Le coton *Gossypium thurberi* indigène de l'Arizona et du Mexique n'est pas compatible sexuellement avec la lignée MON 15985, car son génome (DD) est diploïde.

Le coton sauvage *G. hirsutum* n'a pas été observé au Burkina Faso; il est donc peu probable qu'il y ait hybridation entre des espèces cultivées de coton (*Gossypium hirsutum*) et le coton sauvage *G. hirsutum*. De même, il n'existe en Afrique de l'Ouest aucune espèce de coton sauvage apparentée, qui soit sexuellement compatible. Il existe bien dans la région une espèce étroitement apparentée, *Gossypium herbaceum* var. *africana*; cependant, comme cette espèce est diploïde, il ne peut y avoir de pollinisation croisée efficace avec l'espèce allotétraploïde *G. hirsutum* (et même si un tel croisement devait se produire dans la nature, il donnerait lieu à la production de graines stériles).

Introgression avec du coton cultivé. Bien que des croisements naturels soient possibles, le coton est normalement considéré comme une culture se reproduisant par autopolinisation (Niles et Feaster, 1984). Même si le pollen lourd et collant risque peu d'être disséminé par le vent, la structure de la fleur ne constitue pas en soi un obstacle morphologique à la pollinisation croisée. Le pollen est disséminé par les insectes, principalement par divers apoïdes, bourdons et abeilles domestiques aux États-Unis. L'activité des abeilles domestiques a été étudiée dans des champs de coton du Burkina Faso (Sere, 2007), où elles recueillent le nectar.

La distance sur laquelle il peut y avoir croisement naturel est limitée. McGregor (1976) a ainsi suivi le mouvement du pollen à l'aide de particules fluorescentes et il a constaté que, même parmi les fleurs situées à une distance d'à peine 150 à 200 pi d'un champ de coton entouré d'un grand nombre de colonies d'abeilles, des particules fluorescentes n'ont été observées que sur 1,6 % des fleurs. À titre de comparaison, les distances d'isolement de 1 320 pi sont exigées pour les semences de base et de 660 pi pour les semences de coton certifiées et enregistrées aux États-Unis. Sur la base de renseignements fournis à l'appui de précédentes lignées de coton transgéniques, le département américain de l'Agriculture a déclaré, dans le cadre d'une évaluation environnementale, que "le risque d'introgression de gènes, depuis des lignées de coton

génétiquement modifiées vers des espèces sauvages ou cultivées sexuellement compatibles, est extrêmement faible" [traduction] (USDA, 1995).

Des études menées au Burkina Faso confirment le faible taux d'introgession dans le coton cultivé. Le Tableau 20 résume les taux d'introgession pour la lignée MON 15985, mesurés à différentes distances de la source de pollen durant des essais au champ au Burkina Faso.

Tableau 20 Fréquences d'introgession pour la lignée MON 15985 au Burkina Faso

Distance	Border unsprayed ¹	Border sprayed ²
2 m	5.50%	8.30%
5 m	1.90%	4.20%
10 m	0.80%	5%
15 m	0.40%	0%

1. The border of the field was unsprayed with insecticide. N = 4140

2. The border of the field was sprayed with insecticide. N = 120

Les données recueillies au Burkina Faso indiquent que l'introgession se produit sur de courtes distances (moins de 15 m) à l'intérieur des champs de coton cultivé, ce qui porte à croire qu'il serait possible de maîtriser, au besoin, la dissémination du pollen vers des champs voisins de culture du coton, par l'aménagement de distances d'isolement. Aux États-Unis et au Burkina Faso, on ne s'attend pas à ce qu'il y ait pollinisation croisée avec des espèces de coton sauvages apparentées, car il n'existe pas dans ces pays de variétés sauvages sexuellement compatibles. Au Burkina Faso, le flux génétique se limiterait aux autres espèces de coton cultivé et pourrait être efficacement maîtrisé par de courtes distances d'isolement (15 m).

À la lumière de ces observations, le flux génétique provenant de la culture commerciale de la lignée MON 15985 présentera un risque minime pour l'environnement et n'aura aucun effet prévu sur les espèces menacées ou en voie de disparition.

10.B POTENTIEL D'ETABLISSEMENT ET DE PERSISTANCE

Afin d'évaluer si le potentiel d'envahissement d'une plante transgénique a été altéré par rapport à celui de sa contrepartie conventionnelle, on peut examiner les éléments suivants:

- dissémination des graines;
- dormance des graines;
- germination des graines et survie;
- compétitivité;
- certaines caractéristiques agronomiques, p. ex., le délai de maturité ou la résistance aux maladies et aux ravageurs;
- tolérance au stress.

Étant cultivé comme une annuelle aux États-Unis, le coton n'est pas considéré comme une plante se comportant comme une mauvaise herbe. Il ne possède en effet aucun des

caractères habituellement associés aux mauvaises herbes, comme la dormance des semences, leur longue persistance dans le sol, la germination dans diverses conditions environnementales, une croissance végétative rapide, un court cycle de vie, un haut rendement grainier, ainsi qu'une grande dissémination des semences ou leur dispersion sur de grandes distances. Ces caractéristiques des mauvaises herbes sont contrôlées par des gènes multiples et non uniques. La seule différence à laquelle on pourrait s'attendre entre la lignée MON 15985 et le coton classique serait que le coton MON 15985 résiste mieux aux dommages causés par les insectes foliaires. Cette hypothèse a été confirmée par Eastick et Hearnden (2006) qui ont montré que les gènes *cry1Ac* et *cry2Ab2* ne modifient pas sensiblement la valeur sélective du coton ou son potentiel d'envahissement. Ces auteurs ont conclu que le transfert de ces gènes à des variétés sauvages apparentées ne leur procurerait aucun avantage sur le plan de la valeur sélective.

Au Burkina Faso, le coton n'est pas considéré comme une plante ayant un potentiel d'envahissement. En tant qu'annuelle, cette plante ne possède aucun des caractères habituellement associés aux mauvaises herbes, comme la dormance des semences, leur longue persistance dans le sol, la germination dans diverses conditions environnementales, une croissance végétative rapide, un court cycle de vie, un haut rendement grainier, ainsi qu'une grande dissémination des semences ou leur dispersion sur de grandes distances. Ainsi, aucun plant de coton MON 15985 n'avait repoussé dans les sites d'essais du Burkina Faso, un an après la récolte, les techniques classiques de préparation des lits de semences ayant suffi à éliminer toute semence qui aurait pu survivre. Pour qu'il y ait germination des graines de coton, celles-ci doivent être égrenées et semées dans un sol peu profond. Les graines doivent également être rapprochées les unes des autres, pour que les plantules puissent s'aider à percer la croûte du sol et assurer ainsi le succès de la levée. Les jeunes plants de coton sont faibles et il leur est difficile de percer seuls la surface du sol.

Dissémination des graines. *G. hirsutum* semble avoir un comportement opportuniste en ce qui a trait aux terrains perturbés et ne semble pas particulièrement efficace à envahir les écosystèmes établis. En raison de leur taille et de leurs caractéristiques générales, les capsules de coton risquent peu d'être dispersées par des mécanismes comme le vent, les oiseaux ou les animaux terrestres. Qui plus est, la germination des graines de coton est inhibée par les fibres qui y restent fixées durant la dissémination naturelle des graines.

Germination des graines. Dans la région continentale des États-Unis, les populations sauvages de *G. hirsutum* ne sont présentes que dans l'extrémité sud de la Floride, notamment à cause des conditions de gel qui sévissent dans les autres régions de croissance qui permettent l'hivernage. Les propriétés de germination et de dormance des graines de la lignée MON 15985 ont été évaluées en regard de celles de la variété parentale transgénique (DP50B), de la variété non transgénique (DP50) et de dix variétés de référence. Cette étude a été réalisée par BioDiagnostics, Inc., conformément aux normes établies par l'Association of Official Seed Analysts (AOSA, 2000), selon huit régimes de température. Les échantillons d'essai et les échantillons témoins de graines ont été prélevés en 1999 de trois sites d'essais diversifiés sur le plan géographique, soit le Texas, la Caroline du Sud et la Louisiane. Les variétés de semences de référence ont été obtenues de stocks de semences commerciales. Une numération périodique a été faite des graines germées et dégénérées tout au long de la période d'essai de 12 jours. La viabilité des graines restantes le dernier jour a été évaluée à l'aide du test au tétrazolium, et ont été

réparties selon qu'elles étaient dures ou renflées et fermes (Tableau 21). De plus, durant l'échantillonnage des graines standards prélevées des sites d'essais au champ en 1998, des tests de germination et de vigueur ont été effectués sur 200 graines prélevées dans chaque parcelle à deux endroits (total de 1 600 graines/lignée), conformément aux règles de l'AOSA (Tableau 22).

Tableau 21 Résultats de germination et de dormance des graines de la lignée de coton MON 15985, récoltées à trois endroits en 1999

Temp.	Variety ¹	Mean pvhs (Dormant) ²	Mean pgerm ²	Mean pfms ²	Mean pdegen ²
		(%)	(%)	(%)	(%)
5° C	MON 15985	1.2	0.0	95.1	4.1
5° C	DP50B	0.0	0.0	95.2	5.4
5° C	Ref. Range	(0 - 41)	(0 - 1)	(53 - 99)	(1 - 20)
10° C	MON 15985	0.0	1.2	73.9*	26.4*
10° C	DP50B	0.0	1.3	78.5	21.7
10° C	Ref. Range	(0 - 28)	(0 - 3)	(38 - 91)	(9 - 62)
20° C	MON 15985	0.0	95.4	0.0	5.4*
20° C	DP50B	0.0	97.4	0.0	3.1
20° C	Ref. Range	(0 - 6)	(74 - 100)	(0 - 13)	(0 - 26)
30° C	MON 15985	0.0	93.9*	0.0	6.6*
30° C	DP50B	0.0	98.6	0.0	2.2
30° C	Ref. Range	(0 - 0)	(83 - 100)	(0 - 0)	(0 - 17)
40° C	MON 15985	0.0	85.9	0.0	14.9
40° C	DP50B	0.0	89.3	0.0	11.1
40° C	Ref. Range	(0 - 0)	(70 - 96)	(0 - 0)	(4 - 30)
5/20° C	MON 15985	0.0	NC	NC	NC
5/20° C	DP50B	0.1	NC	NC	NC
5/20° C	Ref. Range	(0 - 29)	NC	NC	NC
10/20° C	MON 15985	0.0	NC	1.9	7.5
10/20° C	DP50B	0.0	NC	1.2	5.8
10/20° C	Ref. Range	(0 - 18)	NC	(0 - 79)	(1 - 31)
20/30° C	MON 15985	0.0	NC	0.0	5.1
20/30° C	DP50B	0.0	NC	0.0	3.7
20/30° C	Ref. Range	(0 - 2)	NC	(0 - 1)	(0 - 17)

* Indicates level of significant difference from DP50B at $P \leq 0.05$.

NC = no comparison of combined means possible due to significant variety by site interaction at $P \leq 0.05$.

1. There were 12 observations for both event 15985 and DP50B, in addition to 44 observations for reference varieties in each temperature regime.
2. pvhs = percent viable hard seed, pgerm = percent germinated seed, pfms = percent viable firm-swollen seed, pdegen = percent degenerated seed.

Tableau 22 Résultats des tests de germination et de vigueur des plants avec des graines récoltées à deux endroits en 1998

Event or Line #	% Germination	% Germination	% Cool Germination at 18° C
	Day 4	Day 9	Day 7
MON 15985	76	77	72
DP50B	83	83	80
DP50	88	89	82

Les résultats des études n'ont révélé aucune différence dans la dormance des graines, entre la lignée MON 15985 et le témoin DP50B (Tableau 21 et 22). Cinq différences ont toutefois été relevées en ce qui a trait aux trois autres paramètres, à savoir le pourcentage de graines germées (pgerm), le pourcentage de graines renflées fermes et viables (pfms) et le pourcentage de graines dégénérées (pdegen). Ces différences n'ont toutefois mis en lumière aucune tendance observable et se situaient dans la fourchette des valeurs établies pour le coton-graine de référence.

G. hirsutum ne se comporte pas comme une mauvaise herbe aux États-Unis et il semble qu'il en soit de même au Burkina Faso. Selon le USDA, le coton ne constitue pas une mauvaise herbe importante, majeure ou répandue aux États-Unis (USDA, 1995).

10.C EFFETS INDESIRABLES SECONDAIRES OU NON VISES POTENTIELS

L'évaluation du risque pour l'environnement doit prendre en considération les effets secondaires qui pourraient résulter de la dissémination dans l'environnement d'une plante transgénique – par exemple les effets sur des organismes non ciblés – en examinant notamment les incidences possibles sur les pratiques agricoles existantes, l'agroécosystème et la biodiversité. La présente discussion sur les effets secondaires potentiels sur des organismes non visés s'appuie sur des exemples utilisant la méthode d'évaluation du risque proposée par la U.S. Environmental Protection Agency, pour déterminer les effets nocifs sur des organismes non visés. Dans le cas des plantes pesticides, la démarche proposée par l'EPA consiste à évaluer le danger potentiel pour la faune terrestre, les animaux aquatiques, les végétaux et les insectes bénéfiques. Si des effets défavorables sont observés en laboratoire (études de niveau 0), des études sur le terrain (études de niveau 1) sont alors requises pour évaluer l'abondance réelle des espèces non visées dans les conditions d'essais et les conditions témoins. En ce qui a trait aux cultures Bt où il pourrait y avoir exposition à des résidus de culture, l'EPA exige la présentation de données sur la toxicité des delta-endotoxines pour les oiseaux (p. ex., le colin de Virginie), les poissons, les abeilles domestiques, certains insectes bénéfiques (p. ex., la coccinelle) et les invertébrés du sol (p. ex., les collemboles, des espèces de lombric).

10.C-1 Organismes d'essai non visés

Un organisme non visé s'entend de tout végétal, animal ou microorganisme sur lequel la culture d'une plante transgénique a des effets involontaires. Les conseils qui suivent, relativement à la sélection des organismes d'essais non visés, sont adaptés des exigences relatives aux données imposées par l'EPA à l'égard des protéines des plantes pesticides :

Espèces aviaires témoins : Jeunes colins de Virginie ou jeunes canards colverts âgés de 14 à 28 jours au début de la période des essais.

Animaux aquatiques : Concernent les végétaux aquatiques exprimant *Bt* et pouvant se trouver dans les forêts, les tranchées de drainage, les bords des rivières et les cultures partiellement submergées telles que celle du riz. Valable également dans le cas des plantes cultivées près de masses d'eau.

Espèces de poissons d'eau douce : Les directives de l'EPA indiquent que les espèces testées doivent être sélectionnées dans la liste des espèces recommandées, à l'exception du cyprin doré (espèces de poissons des eaux chaudes : crapet arlequin, barbe de rivière et méné à grosse tête du Nord ; espèces de poissons des eaux froides : truite arc-en-ciel, truite mouchetée, saumon coho). Ces espèces constituent des organismes témoins souhaités pour plusieurs raisons importantes : elles sont fréquemment utilisées pour évaluer des pesticides chimiques ou microbiens; l'EPA possède un stock de données considérable sur ces espèces; on dispose de méthodes standard pour s'occuper de ces espèces et les manipuler; et enfin, il s'agit d'espèces largement réparties; généralement

disponibles et qui présentent diverses habitudes alimentaires et exigences en termes d'habitat.

Le cas échéant, il faut envisager de tester des espèces représentatives de la zone géographique ou de l'écosystème où la plante pesticide sera cultivée. Il faut également tester, si nécessaire, les espèces de poissons qui risquent de se nourrir d'insectes contaminés ou de tissus végétaux modifiés (tels que ceux retrouvés dans l'alimentation des poissons d'élevage). À moins qu'il n'existe d'autres raisons plus importantes, la truite arc-en-ciel est recommandée comme espèce test des poissons d'eau douce. C'est un bon animal test car il est en partie insectivore.

Espèces d'invertébrés aquatiques : Le tissu végétal le plus probable à tester est le pollen. En raison du large spectre phylogénétique à la disposition du chercheur, il est difficile de sélectionner l'invertébré aquatique le plus approprié. On possède beaucoup de données de base sur la daphnie, de la famille des cladocères, ce qui permet procéder à des études comparatives. De plus, la daphnie présente un effet de bioconcentration. Ceci résulte du mode d'alimentation par filtration de la daphnie et constitue une caractéristique souhaitable si l'on veut s'assurer que l'animal test ingère bien le tissu contenant la toxine. La daphnie et certains insectes aquatiques ont un cycle de vie court et sont utiles pour évaluer les effets reproductifs.

Expérimentation sur des insectes non visés : La sélection des espèces de prédateurs / parasites à tester doit tenir compte de facteurs tels que la probabilité d'exposition à la protéine végétale, la proximité phylogénétique des espèces tests par rapport aux espèces de ravageurs visées et de relations similaires.

L'évaluation d'un danger potentiel pour un insecte non visé est compliquée par un certain nombre de facteurs. Beaucoup de plantes pesticides sont normalement choisies spécifiquement pour leur capacité à lutter contre les insectes ravageurs. Dans la plupart des cas, on peut supposer que le groupe d'insectes non visés le plus menacé sera apparenté à l'espèce de ravageurs. Même si peu d'insectes non visés présentent une importance économique pour les humains, nombre d'entre eux jouent un rôle substantiel dans les processus écologiques et peuvent ainsi être indirectement bénéfiques pour l'homme.

La gamme des hôtes est un facteur important de l'évaluation des risques d'une plante renfermant la protéine pesticide. Un des problèmes rencontrés ici est que l'extrapolation, même sur des lignées d'espèces, n'est pas souvent fiable. C'est pourquoi il faut procéder à des tests avec des représentants de plusieurs taxons "d'insectes utiles". L'EPA recommande de réaliser les expérimentations sur des espèces pollinisatrices telles que les abeilles domestiques et trois autres espèces d'insectes représentant au moins deux des groupes suivants : les diptères parasites, les hémiptères prédateurs, les coléoptères prédateurs, les mites prédatrices, neuroptères prédateurs et les hyménoptères parasites.

Les exigences concernant les évaluations des effets toxiques possibles des plantes renfermant la protéine pesticide sur des organismes du sol représentatifs tels que les collembolles et les vers de terre, reposaient au départ sur la possibilité d'une exposition à long terme de ces organismes à des résidus végétaux incorporés ou abandonnés à la surface du sol. [L'Agence américaine pour la protection de l'environnement (EPA)

n'exige pas de telles expérimentations pour l'homologation des pesticides classiques ou des produits de pulvérisation à base de *Bacillus thuringiensis*]. Une des raisons pour laquelle l'EPA exigeait des essais sur les invertébrés terrestres non visés était qu'elle redoutait que des effets indésirables sur ces espèces causeraient une accumulation de débris végétaux dans les champs de coton. Depuis, l'EPA a découvert, sur la base des éléments d'information disponibles sur les pratiques agricoles courantes actuelles, que l'utilisation à long terme sur le sol d'insecticides chimiques hautement toxiques tels que l'aldicarb, le terbufos, le phorate et le carbofuran, qui ont des effets à long terme sur les espèces d'invertébrés terrestres, n'a pas entraîné d'accumulation de débris végétaux dans les sols. D'ailleurs, certains de ces produits chimiques ont une demi-vie de 10 ans ou plus. Les plantes cultivées renfermant la protéine pesticide, qui devraient avoir un impact moindre sur ces espèces que les pesticides chimiques hautement toxiques, ne devraient donc pas entraîner une accumulation accrue de débris végétaux. À l'appui de cette conclusion, des données indiquent que la production de toxines du *Bt* dans les plantes pesticides cesse à la sénescence du végétal dans la majorité des cultures de maïs *Bt* déposées, ce qui permet un certain temps pour la dégradation des protéines avant la récolte. De plus, les données sur le sort écologique indiquent que pour des cultures de maïs *Bt* actuellement enregistrées, de moins d'un gramme jusqu'à 90 grammes protéines par acre pénétreraient dans le sol suite à une incorporation des végétaux *Bt* dans le sol après la récolte. Puisque les protéines se dégradent rapidement dans le sol, on ne pense pas que la culture de plantes contenant des protéines pesticides puisse causer une accumulation importante dans le sol ou menacer des organismes du sol non visés.

10.C-2 Effets sur les organismes non visés

L'absence d'effets non visés, causés par les préparations microbiennes de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*Btk*) renfermant les protéines Cry, est largement documentée. Les protéines Cry de *Btk* sont en effet extrêmement sélectives pour les lépidoptères (MacIntosh *et al.*, 1990; Klausner, 1984; Aronson *et al.*, 1986; Dulmage, 1981; Whitely et Schnepf, 1986); elles se lient spécifiquement aux récepteurs dans l'intestin moyen des lépidoptères (Wolfersberger *et al.*, 1986; Hofmann *et al.*, 1988a; Hofmann *et al.*, 1988b; Van Rie *et al.*, 1989; Van Rie *et al.*, 1990) et n'ont aucun effet nocif sur les insectes bénéfiques ou non visés (Flexner *et al.*, 1986; Krieg et Langenbruch, 1981; Cantwell *et al.* 1972; EPA 1988; Vinson, 1989). L'écotoxicité de la protéine Cry1Ac dans la lignée MON 531 a été évaluée pour un certain nombre d'organismes de référence (Mendelsohn *et al.*, 2003) et aucun effet indésirable n'a été observé à des concentrations nettement supérieures aux concentrations environnementales prévues.

Protéine Cry2Ab2. Pour confirmer la sécurité pour l'environnement de la protéine Cry2Ab2 présente dans la lignée MON 15985, treize études ont été menées sur des oiseaux, des poissons et des invertébrés terrestres bénéfiques. Les détails de ces études ont été fournis dans la demande, mais ne sont pas présentés ici car il s'agit de renseignements commerciaux confidentiels.

En raison des concentrations extrêmement faibles de protéine Cry2Ab2 dans le coton, il a fallu produire des quantités suffisantes de protéines par fermentation bactérienne pour mettre au point la méthode d'analyse (p. ex., ELISA) et mener les études sur l'innocuité de la protéine. La protéine Cry2Ab2 a été produite dans la souche EG7699 de *Bacillus thuringiensis* puis elle a été purifiée. Pour créer la souche EG7699, le gène *cry2Ab* codant

pour la protéine Cry2Ab2 sauvage a été cloné sur un plasmide bactérien puis il a été introduit dans une souche non cristalline de *B. thuringiensis*, qui fut désignée EG7699. Il a été démontré que le poids moléculaire et l'immunoréactivité de la protéine Cry2Ab2 élaborée par la souche EG7699 de *B. thuringiensis* équivalaient à ceux de la protéine Cry2Ab2 exprimée dans MON 15985. Cette protéine n'a présenté aucune modification post-traductionnelle détectable (glycosylation) et était équivalente sur le plan de la mobilité électrophorétique, de la détection par des anticorps spécifiques et de l'activité fonctionnelle (section 9.B.2; données fournies aux organismes de réglementation, mais non présentées ici car il s'agit de renseignements commerciaux confidentiels).

En résumé, des organismes non visés ont été exposés à des tissus de feuilles ou de graines de plants de coton MON 15985 ou à la protéine Cry2Ab2 incorporée dans le régime alimentaire pendant une durée de cinq jours à huit semaines, selon l'étude (Tableau 23). Les doses ont été établies de manière à dépasser l'exposition prévue dans l'environnement.

Tableau 23 Résumé des études sur les effets de la protéine Cry2Ab2 sur des organismes non visés

Test Organism	Results	Test Substance	Conclusions ¹
Bobwhite Quail	No mortality or toxic effects in birds consuming Cry2Ab2 cottonseed at 10% of diet	MON 15985 cottonseed	MON 15985 cottonseed poses minimal risk
Channel Catfish	No effects on growth or survival in fish consuming MON 15985 cottonseed at 20% of diet	MON 15985 cottonseed	MON 15985 cottonseed can be used in catfish diet at up to 20%, the highest level tested, with no adverse effects
Adult Honey Bee	NOEC = 68 µg Cry2Ab2/ml diet	Cry2Ab2 protein	NOEC ² > 56X predicted maximum Cry2Ab2 concentration in cotton
Larval Honey Bee	NOEC = 170 µg Cry2Ab2/ml, single dose	Cry2Ab2 protein	NOEC > 139X predicted maximum Cry2Ab2 concentration in cotton
Lady beetle	NOEC = 4500 µg Cry2Ab2/ml diet	Cry2Ab2 protein	NOEC > 88X predicted maximum Cry2Ab2 concentration in cotton leaf tissue
Collembola	NOEC = 69.5 µg Cry2Ab2/g diet	MON15985 leaf tissue	NOEC > 17X maximum predicted environmental exposure to Cry2Ab2 protein from cotton in soil
Green Lacewing Larvae	NOEC = 1100 µg Cry2Ab2/g diet	Cry2Ab2 protein	NOEC > 22X maximum predicted environmental exposure to Cry2Ab2 protein from cotton leaf tissue
Parasitic Hymenoptera (Wasp)	NOEC = 4500 µg Cry2Ab2/ml diet	Cry2Ab2 protein	NOEC > 3700X maximum environmental concentration predicted in cotton pollen
Earthworm	NOEC = 330 mg Cry2Ab2/kg dry soil	Cry2Ab2 protein	NOEC ≥ 83X maximum estimated environmental exposure from cotton in soil

1. Calculations were based upon the highest expression value determined from overseason cotton leaf tissue, pollen or soil, as appropriate to the test animal exposure.
2. NOEC = No observed effect concentration.

L'étude sur le colin de Virginie a été réalisée par les Wildlife International Laboratories et celle sur la barbue de rivière a été menée par le Thad Cochran National Warmwater Aquaculture Center de la Mississippi State University. Enfin, les études sur les lombrics et cinq invertébrés représentant des catégories d'insectes qui pourraient être exposées à la protéine Cry2Ab2 présente dans la lignée de coton MON 15985 [abeilles domestiques (*Apis mellifera*) aux stades adulte et larvaire; collemboles (*Folsomia candida*); chrysope verte (*Chrysoperla carnea*); coccinelle (*Hippodamia convergens*); guêpe parasite (*Nasonia vitripennis*) et lombric (*Eisenia fetida*)] ont été menées à l'un des trois endroits

suivants : Wildlife International Laboratories, California Agricultural Research INC ou Springborn Smithers Laboratories Inc.

Essais sur les espèces aviaires. Cette étude a été menée conformément aux normes relatives aux bonnes pratiques de laboratoire publiées par l'Office of Pesticide Programs de l'Environmental Protection Agency des États-Unis, dans le titre 40 du *Code of Federal Regulations* (CFR) (partie 160), à part quelques exceptions n'ayant aucune incidence sur l'intégrité des essais. Cette étude a été basée sur la série 885.4050 (*Nontarget Avian Testing, Tier I*) de l'OPPTS (Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances). Il s'agit d'une méthode scientifique éprouvée qui n'a révélé aucune mortalité ni aucun changement de comportement attribuables au traitement, entre les réplicats expérimentaux et témoins.

Il a été déterminé que la CL₅₀ de la protéine Cry2Ab2 présente dans le tourteau de graines de coton, servi à des colins de Virginie juvéniles pendant cinq jours, était supérieure à 100 000 ppm, car aucune toxicité n'a été observée à ce taux. Or comme 100 000 ppm représente la dose la plus élevée qui a été testée, l'EPA a établi que la concentration sans effet observé (CSEO) est elle aussi supérieure à 100 000 ppm. Ces données indiquent qu'aucun effet nocif sur la faune aviaire ne résultera de l'exposition accidentelle au champ à la protéine Cry2Ab2.

Essais sur les poissons d'eau douce. Cette étude a été menée conformément aux normes relatives aux bonnes pratiques de laboratoire publiées par l'Office of Pesticide Programs de l'Environmental Protection Agency des États-Unis, dans le titre 40 du CFR (partie 160), à part quelques exceptions n'ayant pas eu d'incidence sur l'intégrité des essais. Il s'agit d'une étude non conforme aux lignes directrices, basée sur la série 885.4200 (*Nontarget Freshwater Fish Testing, Tier I*) de l'OPPTS.

Durant une étude de huit semaines sur l'alimentation, aucune toxicité n'a été observée sur la barbue de rivière dont le régime alimentaire contenait 20 % de tourteau de graines de coton dérivé de la lignée MON 15985 incluant la protéine Cry2Ab2. Comme cette proportion de 20 % est la plus forte dose qui a été testée, l'EPA a déterminé que la CL₅₀ alimentaire et la CSEO pour la protéine Cry2Ab2 présente dans le tourteau de graines de coton servi à la barbue de rivière pendant huit semaines sont supérieures à 20 % du régime alimentaire. Ces données indiquent donc que le tourteau de graines de coton produit à partir de la lignée de coton génétiquement modifiée MON 15985 (Cry2Ab2) peut être utilisé dans l'alimentation des barbues de rivière dans une proportion maximale de 20 %, sans provoquer d'effet indésirable sur la croissance, l'indice de consommation, la survie, le comportement ou la composition corporelle. Cette absence d'effets indésirables pourrait être due au fait que la transformation des graines de coton brutes réduit sensiblement la concentration en protéine Cry2Ab2 dans le tourteau de graines, par comparaison aux graines de coton brutes avant leur transformation commerciale (toastage). Une étude similaire réalisée sur du tourteau de maïs qui contenait la protéine Cry2Ab2 non dénaturée (MRID 450863-19) n'a pas démontré d'effets indésirables chez la barbue de rivière, lorsque le tourteau était utilisé dans une proportion de 20 %.

Invertébrés non visés – essais sur le lombric. L'étude a été menée conformément aux normes relatives aux bonnes pratiques de laboratoire publiées par l'Office of Pesticide Programs de l'Environmental Protection Agency des États-Unis, dans le titre 40 du CFR

(parties 160 et 792); aux Principes de l'OCDE relatifs aux bonnes pratiques de laboratoire ainsi qu'aux normes du ministère de l'Agriculture, des Forêts et des Pêches du Japon, à part quelques exceptions n'ayant pas eu d'incidence sur l'intégrité des essais. Les essais ont été basés sur la série 850.6200 (*Earthworm Subchronic Toxicity Test*) de l'OPPTS et la ligne directrice 207 de l'OCDE.

Comme aucun effet n'a été observé durant cette étude, il a été déterminé que la CL₅₀ après 14 jours pour les lombrics exposés à la protéine Cry2Ab2 dans un substrat de sol artificiel est supérieure à 330 mg de protéine Cry2Ab2/kg sol sec; que la concentration sans effet observé est elle aussi supérieure à 330 mg de protéine Cry2Ab2/kg de sol sec, celle-ci étant la concentration maximale testée. Ces données indiquent qu'aucun effet indésirable sur les lombrics n'est anticipé à des concentrations en Cry2Ab2 respectivement 12 et 83 fois supérieures aux concentrations environnementales maximales prévues dans le maïs et le coton. On ne s'attend donc pas à ce que la culture de coton contenant la protéine Cry2Ab ait des effets nocifs observables sur les lombrics.

Essais sur les arthropodes non visés – larves d'abeilles domestiques. Cette étude a été menée conformément aux normes relatives aux bonnes pratiques de laboratoire, publiées par l'Office of Pesticide Programs de l'Environmental Protection Agency des États-Unis, dans le titre 40 du CFR (partie 160), à part quelques exceptions n'ayant pas eu d'incidence sur l'intégrité des essais. Une étude acceptable a été menée conformément à la série 885-4380 (*Honey Bee Testing, Tier I*) de l'OPPTS.

Sur la base de ces études, il a été déterminé que la concentration sans effet observé (CSEO) pour la protéine Cry2Ab2 consommée par les larves d'abeilles domestiques (*Apis mellifera*) est supérieure à 100 µg/mL (ppm) (MRID 453371-02). Ces essais ont évalué la survie à l'operculation et l'émergence et la survie des adultes. Les larves se sont développées en adultes d'aspect et de comportement normaux. Bien que la CSEO n'ait pu être déterminée à partir des résultats d'une autre étude soumise (MRID 450863-07), ces résultats viennent néanmoins corroborer ceux de l'essai MRID 453371-02 ayant démontré l'absence de risque pour les larves d'abeilles domestiques se nourrissant de la protéine Cry2Ab2.

Essais sur des abeilles domestiques adultes. Cette étude a été menée conformément aux normes relatives aux bonnes pratiques de laboratoire publiées par l'Office of Pesticide Programs de l'Environmental Protection Agency des États-Unis, dans le titre 40 du CFR (partie 160), à part quelques exceptions n'ayant pas eu d'incidence sur l'intégrité des essais. Une étude acceptable a été menée conformément à la série 885-4380 (*Honey Bee Testing, Tier I*) de l'OPPTS.

Cette étude a révélé que la concentration sans effet observé (CSEO) pour la protéine Cry2Ab2 servie aux abeilles domestiques (*Apis mellifera*) adultes est supérieure à 68 µg/mL. En résumé, la protéine Cry2Ab2 n'a présenté aucun effet nocif mesurable sur les abeilles domestiques aux stades larvaire et adulte, aux concentrations évaluées.

Essais sur les larves d'hyménoptères parasites. Cette étude a été menée conformément aux normes relatives aux bonnes pratiques de laboratoire publiées par l'Office of Pesticide Programs de l'Environmental Protection Agency des États-Unis, dans le titre 40 du CFR (partie 160), à part quelques exceptions n'ayant pas eu d'incidence sur l'intégrité

des essais. Une étude acceptable a été menée conformément à la série 885-4380 (*Honey Bee Testing, Tier I*) de l'OPPTS.

Les lignes directrices recommandent de mettre fin aux essais lorsque le taux de mortalité atteint 20 % dans le groupe témoin ou après 30 jours. Ces essais auraient dû être menés jusqu'à ce que le taux de mortalité atteigne 20 % dans le groupe témoin ou pendant 30 jours, conformément à la norme 885.4340 de l'OPPTS. Cependant, en raison des taux élevés de mortalité observés dans le groupe témoin et le groupe exposé à une concentration en protéine Cry2Ab2 de 220 ppm, il a fallu mettre fin prématurément à l'étude, et la CL₅₀ n'a pu être déterminée. Le taux élevé de mortalité dans le groupe témoin – taux comparable à celui observé dans le groupe de référence exposé à 100 ppm d'arsénate de potassium – porte à croire que cet effet n'était pas relié au traitement.

Le 18 avril 2002, le promoteur du projet a envoyé une lettre à l'EPA, demandant d'être dispensé des essais de toxicité sur les hyménoptères parasites en alléguant que les hyménoptères parasites ne seraient pas exposés à la protéine Cry2Ab2. Le promoteur précisait en outre que les hyménoptères parasites ne devraient pas être sensibles à la protéine Cry2Ab2, laquelle est hautement spécifique à l'égard des lépidoptères et des diptères. Vu l'absence d'exposition et de sensibilité des hyménoptères parasites aux protéines Cry2Ab2 exprimées dans le coton ou le maïs, l'EPA a autorisé la demande de dispense du promoteur.

Essais sur les larves de chrysope verte. Cette étude a été menée conformément aux normes relatives aux bonnes pratiques de laboratoire, publiées par l'Office of Pesticide Programs de l'Environmental Protection Agency des États-Unis, dans le titre 40 du CFR (partie 160), à part quelques exceptions n'ayant pas eu d'incidence sur l'intégrité des essais.

Cette étude a été menée conformément à la série 885-4340 (*Nontarget Insect Testing, Tier I*) de l'OPPTS, si ce n'est que les essais ont été interrompus à la moitié du stade de pupaison dans le groupe témoin, même si les lignes directrices recommandent de mettre fin aux essais lorsque le taux de mortalité atteint 20 % dans le groupe témoin ou après 30 jours. On sait toutefois que les larves plus jeunes sont plus sensibles à l'action des protéines de Bt que les plus vieilles. On peut s'attendre à ce que les effets indésirables associés à la consommation de la protéine Cry2Ab2 par les larves de la chrysope verte s'observent à la mi-pupaison.

Sur la base de cette étude, la concentration sans effet observé (CSEO) pour la protéine Cry2Ab2 consommée par les larves de chrysope verte a été établie à plus de 1 100 ppm et la DL₅₀ à plus de 4 500 ppm. Cette CSEO est 5,5 fois plus élevée que la concentration maximale dans le maïs et 21,6 fois supérieure à la concentration maximale dans le coton. On peut donc en conclure que l'exposition de la chrysope verte à la protéine Cry2Ab2 au champ n'aura pas d'effets nocifs.

Essais sur les coccinelles. Cette étude a été menée conformément aux normes relatives aux bonnes pratiques de laboratoire publiées par l'Office of Pesticide Programs de l'Environmental Protection Agency des États-Unis, dans le titre 40 du CFR (partie 160), à part quelques exceptions n'ayant pas eu d'incidence sur l'intégrité des essais. Elle est basée sur la série 885-4340 (*Nontarget Insect Testing, Tier I*) de l'OPPTS.

La principale voie d'exposition à la protéine Cry2Ab2, pour les coccinelles aux stades larvaire ou adulte, viendrait de l'ingestion de pollen de coton. Comme on a constaté que certaines coccinelles des groupes expérimental et témoin étaient immobiles ou léthargiques, la CSEO n'a pu être déterminée à partir de cette étude. On peut néanmoins conclure que la CL₅₀ pour les coccinelles adultes se nourrissant de la protéine Cry2Ab2 dépasse 4 500 ppm, ce qui est nettement supérieur à la concentration qui serait observée sur le terrain.

Essais sur les collemboles. Bien que l'étude n'ait pas été menée conformément aux normes relatives aux bonnes pratiques de laboratoire publiées par l'Office of Pesticide Programs de l'Environmental Protection Agency des États-Unis, dans le titre 40 du CFR (partie 160), l'EPA a déterminé qu'elle était scientifiquement valable. Elle a été menée conformément à la série 885-4340 (*Nontarget Insect Testing, Tier I*) de l'OPPTS.

Cette étude a établi que la protéine Cry2Ab2 n'est pas toxique pour les collemboles et qu'elle n'a aucun effet indésirable sur le taux de reproduction de cet insecte. La mortalité observée dans le groupe témoin positif et la présence de tubes digestifs verts dans les autres groupes ont confirmé l'ingestion du coton d'essai par les collemboles. Les résultats de cette étude ont permis d'établir que la concentration sans effet observé (CSEO) chez les collemboles exposés à la protéine Cry2Ab2 dérivée des tissus foliaires du coton et incorporée à leur alimentation était supérieure à 69,5 µg de protéine Cry2Ab2/g d'aliments. Cette étude a permis d'examiner d'une manière adéquate les inquiétudes concernant les effets possibles de la protéine Cry2Ab exprimée dans le coton transgénique sur les collemboles (*Folsomia candida*), une espèce représentative des insectes terrestres bénéfiques. Les résultats obtenus indiquent que les protéines Cry2Ab exprimées dans le coton transgénique ne posent pas de danger pour les collemboles dans le sol et, par inférence, pour les autres insectes bénéfiques du sol.

Il a été établi que les protéines Cry2Ab2 dérivées de la fermentation bactérienne et de sources végétales sont équivalentes sur le plan physiochimique et fonctionnel. Les données des études sur l'alimentation des oiseaux et du poisson confirment l'absence d'effets nocifs sur les oiseaux ou les poissons exposés à la protéine Cry2Ab2 par leur régime alimentaire. Les colins de Virginie et les barbues de rivière, exposés à des graines de coton MON 15985 incorporées dans leur nourriture dans des proportions respectives de 10 % et 20 %, n'ont présenté aucune mortalité, ni aucun effet indésirable sur la survie, la croissance ou le comportement (Tableau 23). Dans les autres études, la concentration sans effet observé a dépassé la concentration maximale prévue dans l'environnement dans des proportions de dix à cent fois (Tableau 23), ceci indiquant une grande marge de sécurité pour ces organismes. Enfin, aucun effet indésirable n'a été observé à la concentration maximale à laquelle les organismes pourraient être exposés dans l'environnement. Ces observations corroborent les observations recueillies sur le terrain pour des populations non visées, dans le cadre de nombreux essais en plein champ (données non fournies).

En résumé, aucun effet nocif associé à la protéine Cry2Ab2 n'a été observé, et ce à des concentrations nettement supérieures à celles prévues dans l'environnement (Tableau 23).

10.C-3 Considérations liées aux espèces en voie de disparition aux États Unis

À la lumière des données présentées sur l'exposition aux protéines Cry1Ac et Cry2Ab2 et sur la toxicité de ces protéines, on ne s'attend pas à ce qu'elles présentent un risque pour les espèces de mammifères, d'oiseaux, de végétaux ou d'organismes aquatiques, menacées ou en voie de disparition. Les essais sur les organismes non visés confirment les hypothèses selon lesquelles la toxicité des protéines Cry1Ac et Cry2Ab2 se limite aux larves des lépidoptères; les espèces menacées ou en voie de disparition n'appartenant pas à l'ordre des lépidoptères ne seront donc pas touchées par ces protéines. La pollinisation du coton se fait par les insectes et il est peu probable que le pollen contenant des protéines Cry soit disséminé hors des champs. Quoi qu'il en soit, des doses relativement élevées de protéines Cry1Ac et Cry2Ab2 ont été testées et se sont révélées non toxiques pour des espèces représentatives des organismes susceptibles d'être exposés à ce pollen (p. ex., coccinelles, chrysopes vertes, abeilles domestiques).

La probabilité que les protéines Cry1Ac et Cry2Ab2 aient des effets sur des lépidoptères non visés a été évaluée à partir des connaissances sur l'action de ces protéines sur les lépidoptères nuisibles. On se rappellera que le danger doit être combiné à l'exposition pour créer un risque et que l'exposition aux protéines Cry2Ab2 ne se produira que par la dérive du pollen vers les plantes hôtes préférées des lépidoptères non visés. Comme le coton n'est pas considéré comme une plante pollinisée par le vent, il est peu probable qu'il y ait dépôt de pollen sur les plantes hôtes. Les données indiquent en outre que l'expression de la protéine Cry2Ab dans le pollen est très faible; il faudrait donc que le dépôt et la consommation soient très élevés pour observer des effets négatifs.

À titre d'exemple, un examen d'espèces de lépidoptères en voie de disparition dans les comtés de culture du coton (le papillon damier Quino Checkerspot, dans le comté de Riverside en Californie; le papillon Saint Francis' Satyr, dans les comtés de Cumberland et de Hoke en Caroline du Nord et le sphinx Kern Primrose dans le comté de Kern, en Californie) a déterminé qu'il est peu probable que ces espèces soient exposées aux protéines Cry, car leurs habitats ne chevauchent pas les champs de coton. (Le papillon Quino Checkerspot n'est présent que dans les broussailles de sauge des régions côtières du sud de la Californie, la présence du sphinx Kern Primrose n'a été observée que sur un ranch privé situé à Walker Basin, dans le comté de Kern en Californie et les seules populations connues du papillon Saint Francis' Satyr ont été recensées dans des terres humides dominées par la sauge et les graminées, sur des propriétés de l'État en Caroline du Nord.) Les larves de ces espèces ne se nourrissent pas de coton et ne seront pas exposées aux protéines Cry dans le pollen. La quantité de pollen qui pourrait être disséminée des plants de coton vers des végétaux consommés par des espèces menacées ou en voie de disparition serait par ailleurs très faible, en comparaison aux quantités consommées par les espèces utilisées pour les essais. L'EPA ne prévoit donc pas de risque potentiel pour quelque espèce menacée ou en voie de disparition et, s'il devait y avoir exposition, les concentrations en protéines Cry1Ac et Cry2Ab2 seraient trop faibles pour avoir une incidence sur ces lépidoptères.

10.C-4 Effets combinés des protéines Cry1Ac et Cry2Ab2

La lignée MON 15985 contient les protéines Cry1Ac et Cry2Ab2. Les essais sur les organismes non visés, menés séparément pour les protéines Cry1Ac et Cry2Ab2, n'ont révélé aucun danger pour les espèces non visées. De plus, on ne s'attend à aucun effet de synergie de la lignée MON 15985, car aucun effet nocif n'a été observé durant plusieurs

essais sur des organismes non visés (espèces aviaires, lombrics et collemboles) réalisés avec des tissus contenant les deux protéines Cry. Ces études corroborent les observations au champ recueillies aux États-Unis. Durant les essais d'efficacité (section 9.C.2), des insectes non visés ont été recensés dans 24 % des endroits, mais aucune différence n'a été observée chez les thrips, les pucerons, les pentatomes, les punaises, l'anthonome du cotonnier et le tétranyque rouge, les thrips étant les insectes non visés les plus souvent observés. Aucune différence substantielle dans les infestations par des organismes non visés et la gravité de ces infestations n'a été relevée entre la lignée MON 15985 et les plants témoins, à quelque endroit.

En 2004, une étude de confirmation a été entreprise à la station de recherche du Burkina Faso (Farako-Bâ), pour évaluer les effets de la lignée MON 15985 sur les populations d'insectes non visés – principalement des espèces prédatrices – souvent présentes dans le coton. Cette étude en cours a pour principaux objectifs de comparer les effets de la lignée MON 15985 et du coton classique sur les populations d'insectes non visés durant toute la saison de croissance, ainsi que d'évaluer tout effet potentiel en regard de ceux associés aux pratiques classiques de production, en utilisant des insecticides sélectifs et à large spectre. Les résultats indiquent essentiellement l'absence d'effets causés par la lignée MON 15985 sur les insectes non visés et n'indiquent dans l'ensemble qu'une réduction mineure de la densité des insectes non visés dans les parcelles traitées avec des insecticides (Tableau 24).

Tableau 24 Étude sur les effets de la lignée MON 15985 sur les insectes non visés à Farako-Bâ (2004-2005)
Nombres d'insectes piégés dans les champs

Test organisms	MON 15985 ^a	DP 50 ^a	FK 37 ^a	FK 37 ^b
Coccinellidae	9	4	2	3
Staphilinidae	6	1	6	8
Total Coleoptera	15	5	8	11
Apidae	40	22	30	16
Vespidae	11	1	12	0
Sphecidae	33 ^a	14 ^b	19 ^a	12 ^b
Formicidae	17	13	11	13
Braconidae	2	0	2	1
Ichneumonidae	1	1	1	1
Total Hymenoptera	104 a	51 b	75 a	43 b
Grillonidae	0	0	1	0
Total Orthoptera	0	0	1	0
Blattidae	3	1	2	1
Mantidae	0	0	0	1
Total Dytioptera	3	1	2	2
Arachnidae	1	1	3	1

a Without pesticide treatment.

b Treated according to the guidelines adopted by cotton producers.

Les données fournies dans la demande et examinées précédemment témoignent généralement de l'innocuité des protéines Cry1Ac et Cry2Ab2 exprimées dans la lignée MON 15985, pour les insectes bénéfiques et autres insectes non visés souvent présents dans les champs de coton. L'absence d'effets toxiques mis en lumière par les études sur les organismes non visés, même à des concentrations en protéines Cry1Ac et Cry2Ab2

nettement supérieures à l'exposition maximale prévue dans l'environnement, montre que ces protéines n'auront pas d'effets indésirables sur ces organismes et d'autres organismes non visés apparentés, y compris les espèces menacées et en danger de disparition.

Protéine GUS. La protéine GUS n'a pas d'effet insecticide et rien n'indique que cette protéine cause des dommages à l'environnement (Gilissen *et al.*, 1998).

Potentiel d'organisme nuisible. Les données et les éléments d'information recueillis à l'appui de cette demande indiquent que la lignée MON 15985 ne présente pas, à elle seule, un risque de devenir un organisme nuisible aux États-Unis. En effet, de vastes essais en laboratoire et au champ ont démontré que le comportement agronomique de la lignée MON 15985 se compare à celui des variétés classiques de coton, lesquelles ont été confirmées comme ne présentant pas de risque de devenir un organisme nuisible dans ce pays.

Si l'on tient compte de toute l'information disponible, la valeur probante de la preuve ne fait état d'aucun effet nocif déraisonnable associé à l'expression séparée ou combinée des protéines Cry1Ac et Cry2Ab2 dans le coton. L'absence de toxicité de la protéine GUS et l'innocuité reconnue de la protéine NPTII, combinées aux niveaux d'exposition dans l'environnement, indiquent que la lignée MON 15985 n'aura pas d'effets négatifs sur les organismes non visés, y compris les espèces menacées et en voie de disparition présentes dans leur milieu de dissémination. En conclusion, sur la base des antécédents d'utilisation sans danger des protéines NPTII et GUS et du mode d'action bien caractérisé des protéines Cry, de la sélectivité des toxines Cry1Ac et Cry2Ab2 pour certains lépidoptères ravageurs et des études (relation dose-effet et utilisation d'une forte dose unique) confirmant l'absence d'effets nocifs, il est hautement improbable que la lignée MON 15985 présente des dangers pour les organismes non visés au Burkina Faso.

10.D DEVENIR DANS L'ENVIRONNEMENT ET EXPOSITION AUX PROTEINES EXPRIMEES

Les organismes présents dans le sol pourraient être exposés aux endotoxines provenant de plantes transgéniques cultivées, par l'exposition aux racines, l'incorporation dans le sol de tissus végétaux aériens après la récolte ou le dépôt de pollen sur le sol. Il peut y avoir exposition aux racines lorsque les organismes se nourrissent de racines mortes ou vivantes ou, en théorie, par ingestion ou absorption après la sécrétion d'endotoxines dans le sol. Les données indiquent en outre que certaines composantes du sol, par exemple les argiles et les acides humiques, lient les endotoxines d'une manière qui les rend récalcitrantes à la dégradation par les microorganismes du sol, sans éliminer leur toxicité pour les insectes. Les endotoxines liées aux particules du sol pourraient donc être une voie d'exposition pour certains organismes terrestres.

Le devenir dans l'environnement des protéines Cry purifiées a été largement étudié. Le USDA a ainsi mené des évaluations environnementales sur les protéines Cry et conclu à l'absence d'impact significatif (FONSI) associé à la protéine Cry1Ac (USDA, 1995). En plein champ, les cristaux des protéines Cry se dégradent rapidement sous l'action des rayonnements solaires et de la température (Palm *et al.*, 1993, 1994, 1996). L'adsorption des protéines Cry au sol est rapide et se fait en moins de 30 minutes (Venkateswerlu et Stotzky, 1992). D'autres études sur la biodégradation et la fixation des protéines Cry dans

le sol (Tapp *et al.*, 1994; Tapp et Stotzky, 1995; 1998; Crecchio et Stotzky, 1998; Koskella et Stotzky, 1997) ont révélé la liaison de protéines Cry isolées aux particules d'argile et aux acides humiques dans des mélanges terreux artificiels.

À partir des concentrations en protéine Cry1Ac mesurées dans les plantes entières de coton MON 531 à maturité, prélevées durant des essais au champ réalisés en 1992 et 1993, on a estimé que la charge en protéine Cry1Ac dans le sol était respectivement de 1,44 et 0,6 g/acre.

À partir de ces valeurs, une étude *in vitro* sur la dégradation dans le sol a été menée, en utilisant l'activité insecticide pour mesurer la dégradation des protéines dans la lignée MON 15985. Cette étude sur le TD₅₀ (temps pour obtenir 50 % de dégradation) a été réalisée à l'appui de la demande d'homologation présentée en Australie pour la lignée de coton MON 15985 contenant les protéines Cry2Ab2 et Cry1Ac (données non fournies).

Selon ces études, les protéines Cry2Ab2 et Cry1Ac se dégradent rapidement dans les sols limoneux-sableux (type de sol caractéristique de la culture du coton). Le TD₅₀ a été de 2,3 jours et le TD₉₀ de 15 jours, 75 % des protéines s'étant dégradées durant la première semaine d'incubation. Il convient toutefois de noter que l'étude sur la protéine Cry2Ab2 a été réalisée avec le ver de la capsule du coton (*Helicoverpa zea*), utilisée comme espèce indicatrice pour l'épreuve biologique des insectes. Or le ver de la capsule du coton n'est pas aussi sensible à l'action de la protéine Cry2Ab2 que d'autres lépidoptères et il est moins sensible à la protéine Cry2Ab2 qu'à la protéine Cry1Ac. Il a donc été impossible de déterminer un temps de dégradation exact (TD₅₀) à partir de cette étude.

L'étude sur la lignée MON 531 montre que la protéine Cry1Ac se dégrade rapidement dans le sol, qu'elle soit sous forme purifiée ou à l'intérieur des tissus du coton. Il a été calculé que la demi-vie de la protéine Cry1Ac dans les tissus végétaux est de 41 jours, ce qui se compare aux taux de dégradation pour les préparations microbiennes de *B. thuringiensis* (Betz *et al.*, 2000); la demi-vie de la protéine purifiée a été inférieure à 20 jours. Ces valeurs sont similaires aux taux de dégradation observés par Palm *et al.*, (1993, 1994, 1996) pour des plantes transgéniques exprimant les protéines Cry. Cependant, l'étude sur la dégradation dans le sol de la protéine Cry2Ab2 n'a pas été menée avec une espèce indicatrice très sensible, et les résultats ne sont pas concluants. De plus, cette étude n'a pas été réalisée avec des sols riches en argile et en acides humiques; or comme ces matériaux du sol ralentissent la dégradation de ces toxines par les microbes, les résultats pourraient ne pas être parfaitement comparables.

11. AUTRES CONSIDÉRATIONS

En matière de biosécurité, l'évaluation du risque vise à déterminer l'impact d'un organisme transgénique sur son milieu récepteur, y compris son innocuité pour les cultures vivrières et fourragères. Cependant, durant l'évaluation des risques associés aux organismes transgéniques, les examinateurs soulèvent parfois des questions liées à l'utilisation de la technologie, qui ne relèvent pas de la sécurité. Ces autres considérations non liées à la sécurité ont des dimensions essentiellement sociales et économiques et peuvent être prises en compte, hors du cadre d'évaluation de la biosécurité, lorsque la réglementation nationale en autorise l'examen dans la prise de décisions sur les questions

de biosécurité. Parmi les dimensions sociales pouvant être prises en considération, mentionnons les questions d'ordre éthique, les effets sur le patrimoine traditionnel ou les exigences alimentaires culturelles. Les dimensions économiques peuvent quant à elles porter sur l'accès aux nouvelles technologies ou leur incidence sur le commerce et d'autres technologies existantes, par exemple le développement chez les insectes d'une résistance aux mesures classiques de lutte antiparasitaire. Certains pays ont des politiques nationales qui exigent que les impératifs nationaux (p. ex., la réduction de la pauvreté, la création d'emplois, la protection de l'environnement, l'amélioration des soins de santé, la sécurité alimentaire et le développement durable) soient pris en compte à tous les échelons du processus décisionnel. Un élément essentiel à l'examen de ces aspects non liés à la sécurité est la détermination des paramètres qui serviront à évaluer l'impact de l'introduction des organismes transgéniques. La définition précise de ces paramètres (c.-à-d. le facteur précis qui pourrait être touché, p. ex., les effets sur les exportations ou le revenu rural) permettra d'évaluer les impacts et de mener l'examen en toute transparence.

11.A INCERTITUDE RÉSIDUELLE

On s'intéresse beaucoup à la question voulant que les modifications génétiques par la technique de l'ADN recombinant peuvent avoir des conséquences imprévues ou involontaires, susceptibles de causer des dommages à l'environnement. Cependant, toutes les méthodes de modification génétique, y compris les techniques classiques de croisement, peuvent avoir des conséquences imprévues, et rien n'indique que cette possibilité soit plus grande avec les méthodes de sélection utilisant la biotechnologie moderne qu'avec les méthodes plus classiques. Les conséquences involontaires sont généralement de deux types, c.-à-d. prévisibles et imprévisibles. Certaines conséquences involontaires peuvent ainsi être prévisibles, d'après les connaissances sur l'activité biologique de la nouvelle protéine exprimée, y compris sa participation aux voies métaboliques. Quant aux conséquences imprévisibles, elles peuvent être le résultat de l'action de gènes exogènes liés au caractère visé, de modifications et réarrangements génomiques ou d'effets pléiotropes causés par le nouveau caractère.

L'accumulation de glyco-alcaloïdes potentiellement toxiques dans les tubercules de pomme de terre est un problème connu lié à l'innocuité des aliments. Durant la sélection classique de la pomme de terre, il y a un risque que la complémentation des gènes dérivés des lignées parentales entraîne une hausse imprévue de la teneur en glyco-alcaloïdes, en particulier s'il y a introgression à partir d'espèces sauvages. À titre d'exemple, les cultivars de pomme de terre Lenape (États-Unis et Canada) et Magnum Bonum (Suède) ont tous deux été retirés en raison de la teneur excessive en glyco-alcaloïdes de leurs tubercules (Zitnak et Johnston, 1970; Hellenäs *et al.*, 1995). Ces faits témoignent de l'importance de vérifier systématiquement la teneur en glyco-alcaloïdes des nouveaux cultivars de pomme de terre, produits par sélection classique ou génie génétique. Il est cependant raisonnable de s'attendre à ce que des conséquences involontaires ayant un effet significatif sur la sécurité d'une culture – p. ex., la sous-régulation ou l'interruption d'un gène codant pour une importante enzyme métabolique – auront des manifestations phénotypiques qui deviendront apparentes durant des analyses rigoureuses du phénotype, du comportement agronomique et de la composition du nouveau produit, de la même manière que les modifications nocives imprévues sont décelées et supprimées durant la

sélection classique des végétaux. Une des particularités de la création de plantes et d'animaux transgéniques est que les effets métaboliques vraiment nocifs ne peuvent produire d'organismes viables et que, lorsque vient le temps de passer aux essais au champ d'une lignée transgénique, les changements macroscopiques dans le phénotype ont déjà été éliminés.

Dans certains cas, l'importance accordée dans la réglementation aux conséquences involontaires (effets inconnus) est devenue l'élément moteur justifiant des exigences toujours plus complexes en matière de données, pour la caractérisation génétique moléculaire des cultures transgéniques. Ceci a donné lieu en quelque sorte à une "course aux armements moléculaires", dans le cadre de laquelle les organismes de réglementation ayant accès aux techniques de diagnostic moléculaire de pointe ont établi des exigences coûteuses en matière de données, qui n'offrent pas pour autant plus de certitude quant à la sécurité d'un produit. En ce qui a trait plus particulièrement à l'évaluation du risque environnemental et à l'approbation des essais au champ, les exigences excessives relatives à la présentation de données moléculaires ne font qu'accroître les délais et les coûts pour la mise au point de cultures transgéniques. Or ce sont les pays moins développés qui sont les plus désavantagés lorsque les exigences en matière de données sont excessives, inutiles et prohibitives, car les investissements nécessaires pour satisfaire à ces exigences forcent les promoteurs de projets à mettre l'accent sur les cultures qui offriront les meilleurs rendements financiers.

Dans le même ordre d'idées, mentionnons l'intérêt récent pour la mise au point de techniques non ciblées ou de techniques de profilage pour dépister les changements potentiels dans la physiologie de la plante modifiée à différents niveaux, notamment au niveau du génome, de la transcription (transcriptome) et de la traduction (protéome) du génome, ainsi que des voies métaboliques (métabolome). Or la sensibilité de ces diverses techniques de profilage basées sur toutes ces sciences en « omique », à détecter des changements même discrets, limite la capacité d'évaluer la signification biologique des différences observées. Ainsi, les changements dus à des modifications génétiques précises pourraient être masqués par des différences résultant d'une série d'autres facteurs, notamment des caractéristiques génétiques (cultivar, individu, lignées isogéniques, hétérosis); des facteurs agronomiques (sol, application d'engrais ou de pesticides); des influences environnementales (effet du lieu, climat, heure du jour, stress abiotique); des interactions plantes-microbes (état pathologique); le stade de maturité ou des effets consécutifs à la récolte (conditions d'entreposage, mélange accidentel). Bien que ces méthodes en soient encore aux premiers stades de développement et qu'elles aient été peu utilisées pour l'évaluation des risques environnementaux, on craint que l'évaluation du risque devienne trop axée sur la « recherche des différences », sans chercher à comprendre la signification biologique et environnementale des différences observées. Il est probable que cela aura pour effet d'accroître les incertitudes pour l'organisme de réglementation, en raison de l'écart entre l'information recueillie et sa signification pour l'évaluation de la sécurité.

L'adoption efficace de politiques réglementaires reconnaissant les sources d'incertitude résiduelle à l'égard des cultures transgéniques exigera une démarche plus éclairée en ce qui a trait à la pléiotropie et aux effets involontaires. Les retards occasionnés du fait que les organismes de réglementation doivent évaluer des données dont ils ignorent la pertinence aux fins de l'évaluation de la sécurité engendrent un risque différent, celui de

la non-adoption d'une technologie nouvelle qui pourrait réduire les risques associés aux pratiques agricoles existantes. La décision d'exiger la présentation de certains éléments d'information pour l'évaluation du risque doit donc être examinée avec soin, en reconnaissant le fait qu'il n'est pas toujours approprié ou utile pour la société de simplement en demander plus.

11.B GESTION DE LA RESISTANCE DES INSECTES ET BONNE GESTION DES PRODUITS

Aux États-Unis, on a demandé l'utilisation d'un refuge naturel pour la lignée MON 15985 (plutôt que d'un refuge cultivé fait de coton non transgénique), après que des données scientifiques eurent indiqué qu'un nombre suffisant de vers de la capsule du coton et de noctuelles verdoyantes étaient présents dans des cultures autres que le coton et d'autres végétaux, dans les régions de culture admissibles. La présence naturelle de ces organismes nuisibles hors du coton, combinée à la double efficacité de la lignée de coton MON 15985, réduit considérablement la probabilité que ces ravageurs acquièrent une résistance au coton MON 15985.

En juin 2007, l'Environmental Protection Agency (EPA) des États-Unis a approuvé l'utilisation d'un refuge naturel pour la lignée de coton protégée contre les insectes MON 15985, cultivée dans des régions clairement définies aux États-Unis. Cette option permet aux producteurs de coton des régions admissibles de considérer des cultures autres que le coton et d'autres végétaux comme un refuge pour certains ravageurs. Lorsqu'une quantité suffisante de plantes naturelles servant de refuge sont disponibles, les agriculteurs ne seront pas tenus de planter une culture refuge de coton non Bt pour la lignée MON 15985.

Les régions admissibles à l'utilisation d'un refuge naturel pour la lignée de coton MON 15985 sont les plantations situées dans les États suivants : Alabama, Arkansas, Floride, Géorgie, Kansas, Kentucky, Louisiane, Maryland, Missouri, Mississippi, Caroline du Nord, Oklahoma, Caroline du Sud, Tennessee, Texas (excluant les comtés de Brewster, Crane, Crockett, Culberson, El Paso, Hudspeth, Jeff Davis, Loving, Pecos, Presidio, Reeves, Terrell, Val Verde, Ward et Winkler) et Virginie.

Les États et les comtés où l'option de refuge naturel n'est pas autorisée sont celles où le ver rose de la capsule du cotonnier est un ravageur important. L'aménagement d'un refuge structuré, composé de coton non Bt, continuera donc d'être exigé dans le cadre du programme de gestion de la résistance des insectes, dans tous les États pour la lignée MON 531 et en dehors des régions admissibles pour la lignée MON 15985.

Une dispense similaire, relativement à la gestion de la résistance des insectes, pourrait s'appliquer à la lignée MON 15985 cultivée au Burkina Faso, où l'on sait que les insectes ravageurs se nourrissent du coton, du maïs et de végétaux sauvages (section 8.A-8.).

11.C INCIDENCES SUR L'AGRICULTURE, Y COMPRIS LES AVANTAGES DE L'ADOPTION

L'augmentation sensible de la population et l'urbanisation rapide ont accru la demande régionale de produits agricoles en Afrique occidentale. Dans les régions du Sahel, le coton est l'une des seules cultures commerciales viables et est en fait une des réussites de

l'agriculture sahélienne, le coton ayant contribué à améliorer le revenu, les moyens de subsistance et l'accès aux installations sociales (éducation, centres de santé et pharmacies, etc.). La culture du coton semble également liée à une augmentation rapide de la production de céréales, grâce aux systèmes de soutien de la production de coton (offerts par l'État et les sociétés nationales de coton), ainsi qu'à la promotion de processus novateurs. De fait, dans la plupart des zones ayant profité des systèmes de soutien de la production de coton, le boom du coton s'est accompagné d'un boom agricole qui a favorisé une augmentation de la production de céréales (Hussein *et al.*, 2005).

De un à deux millions de ménages ouest-africains, environ, cultivent le coton, et on estime que jusqu'à 16 millions de personnes tirent des avantages directs ou indirects de la culture du coton. En Afrique occidentale, ces exploitations agricoles familiales génèrent de 30 à 50 % du PIB national (selon le pays) et elles sont également, dans certains pays, la principale source de recettes d'exportation. De plus, ces exploitations produisent la presque totalité des denrées de consommation courante, des oléagineux et des cultures commerciales de la région, en plus d'être d'importants consommateurs de divers fruits, légumes et produits transformés importés (Hussein *et al.*, 2005).

Comme toute autre technologie exigeant un apprentissage par la pratique, il faut parfois du temps pour tirer avantage des rendements plus élevés que procure une technologie améliorée. De plus, certaines régions qui cultivent actuellement du coton non transgénique pourraient ne pas être propices à la culture du coton transgénique résistant aux insectes, ce qui réduira l'avantage en termes de rendement (p. ex. 10 à 20 %). Le taux d'adoption n'est pas certain dans la région. En effet, l'adaptation au coton transgénique résistant aux insectes exige nécessairement la participation du promoteur du projet, et ceci a d'importantes ramifications institutionnelles qui se répercutent ensuite sur le taux d'adoption (Sanders *et al.*, 2005).

Le Tableau 25 résume l'ensemble des avantages aux niveaux national et régional, découlant de l'introduction du coton transgénique résistant aux insectes, en regard de trois taux d'adoption et de trois hypothèses quant aux avantages en termes de rendement. Les résultats varient selon les effets sur les avantages pour chaque groupe d'intérêt du secteur du coton. Les estimations de Sanders *et al.* (2005) font référence aux avantages bénéficiant directement aux agriculteurs. Les avantages pour les compagnies de coton (seul fournisseur des intrants de production et unique acheteur du coton) et le propriétaire de la technologie n'ont pas été explicitement examinés dans leur analyse.

Tableau 25 Ensemble des avantages associés à la culture du coton transgénique résistant aux insectes, selon différents taux d'adoption (Sanders *et al.*, 2005)

Country	Cotton area ¹ (1000ha)	Total benefits ² (million US\$)		
		100% adoption	50% adoption	30% adoption
45% yield advantage				
Mali	493	67	34	20
Burkina Faso	300	41	20	12
Benin	383	52	26	16
Côte d'Ivoire	281	38	19	11
Senegal	55	7	4	2
Total	1512	205	103	61
30% yield advantage				
Mali		45	23	14
Burkina Faso		28	14	8
Benin		35	18	10
Côte d'Ivoire		26	13	8
Senegal		5	2	1
Total		139	70	41
10% yield advantage				
Mali		23	11	7
Burkina Faso		14	7	4
Benin		18	9	5
Côte d'Ivoire		13	6	4
Senegal		3	1	1
Total		71	34	21

1 Two-year average area (1998-2000) data provided by IER.

2 Derived by multiplying land area by the difference in per hectare profits from cotton between Bt and non-Bt.

Un important facteur susceptible d'influencer le taux d'adoption pourrait être le coût plus élevé des semences transgéniques ou les droits exigés pour l'utilisation de la technologie pour la production de ces cultures. Dans leur analyse ex-ante des coûts et des avantages liés à l'introduction du coton transgénique résistant aux insectes en Afrique occidentale, Sanders *et al.* (2005) ont examiné les incidences de l'imposition de droits technologiques sur la combinaison de cultures et les profits agricoles des producteurs de coton ouest-africains (Tableau 26). Leur analyse indique que l'imposition de droits élevés pour l'utilisation de la technologie diminuera le taux d'adoption du coton transgénique résistant aux insectes ainsi que les profits réalisés par les producteurs ouest-africains.

Tableau 26 Effet de l'imposition de droits liés à l'usage de la technologie du coton transgénique résistant aux insectes sur le mélange de cultures et les profits agricoles (Sanders *et al.*, 2005)

Particulars	Alternative technology fee (US dollars per hectare)				
	\$15	\$50	\$60	\$70	\$80
Area (hectares)					
Cereals					
Sorghum	2.7	2.4	2.3	2.2	2.4
Millet	3.9	4.2	4.6	4.9	3.9
Maize	2.9	3.2	3.3	3.4	3.2
Cash crops					
Groundnut	-	0.3	0.3	0.3	0.3
Non-Bt	-	-	-	-	3.1
Bt-cotton	5.5	4.9	4.6	4.2	2.1
	Farm profit (US\$)				
	1,593	1,213	1,080	967	890

Note: Yield advantage of 45% was used in the estimation procedure.

Sanders *et al.* (2005) ont néanmoins estimé que les avantages seraient appréciables pour les pays de l'Afrique occidentale, leurs estimations variant de 7 à 67 millions de dollars au Mali; de 4 à 41 millions au Burkina Faso; de 5 à 52 millions au Bénin; de 4 à

38 millions en Côte d'Ivoire et de 1 à 7 million au Sénégal. À cela s'ajoute un avantage environnemental résultant de la réduction de l'usage d'insecticides. Ainsi, en présumant un taux d'adoption de 100 % et une réduction de 3 litres par hectare de l'application d'insecticides, le Mali réduirait son utilisation d'insecticides de 1 500 tonnes, le Burkina Faso de 900 tonnes, le Bénin de 1 100 tonnes, la Côte d'Ivoire de 843 tonnes et le Sénégal de 165 tonnes.

Dans leur examen des incidences des cultures transgéniques sur le commerce, Brookes et Barfoot (2006) ont calculé qu'environ 26 % de la production mondiale de coton a été destinée au marché international en 2005-2006. Parmi les principaux exportateurs, deux pays faisant la culture du coton transgénique – soit les États-Unis et l'Australie – ont obtenu 54 % du commerce mondial. D'après la proportion que représentait la production de coton dans les pays cultivant des plantes transgéniques en 2005, on a estimé que le coton transgénique a représenté alors 47 % du commerce mondial. Cependant, comme ces pays ne font pas réellement de distinction entre les exportations de coton transgénique et non transgénique (c.-à-d. le coton exporté est probablement composé d'un mélange de coton transgénique et non transgénique), on peut raisonnablement s'attendre à ce que la part du coton transgénique dans les exportations mondiales a été plutôt de 57 % en 2005 (Brookes et Barfoot, 2006). En ce qui a trait au tourteau de graines de coton, le coton transgénique représente environ 37 % du commerce mondial (Brookes et Barfoot, 2006).

Dans leur examen des avantages découlant de l'adoption du coton transgénique en Afrique du Sud, Gouse *et al.* (2004) ont constaté qu'en plus des avantages sur le rendement, l'adoption du coton transgénique résistant aux insectes réduit le volume d'insecticides pulvérisés. Or la diminution de l'épandage d'insecticides signifie également une baisse des coûts d'épandage. Pour les grandes exploitations agricoles, cela représente une diminution des coûts du diesel et du nombre d'heures d'utilisation des tracteurs. Pour les petits agriculteurs, les avantages se traduisent principalement par des économies de main-d'œuvre, car l'agriculteur doit marcher de 10 à 20 km pour faire l'épandage manuel des pesticides sur un seul hectare de coton – en portant le pulvérisateur sur son dos. En général, la diminution des pulvérisations permet également de consacrer plus de temps au désherbage et à d'autres pratiques culturales. À cela s'ajoute un autre avantage pour les petits agriculteurs qui doivent transporter, à la main, l'eau puisée de la source commune pour la mélanger aux insecticides, sans parler de la rareté d'eau propre dans les régions arides. Enfin, les maladies dues à l'exposition aux pesticides ne sont pas rares chez les petits agriculteurs d'Afrique du Sud (Gouse *et al.*, 2004).

Un fort pourcentage de grands agriculteurs estiment que le fait de ne pas avoir à s'inquiéter du ver de la capsule du coton est un avantage appréciable résultant de l'utilisation du coton transgénique résistant aux insectes en Afrique du Sud (Gouse *et al.*, 2004). Cette tranquillité d'esprit leur offre en retour une certaine liberté et leur permet de consacrer du temps à d'autres cultures ou à d'autres activités agricoles — une tranquillité d'esprit dont la valeur pourrait être déterminée à partir de l'augmentation de la production des autres cultures. Les grands producteurs ont aussi observé une augmentation des populations d'insectes bénéfiques (comme les coccinelles et les chrysopes) dans les champs de coton transgénique résistant aux insectes, ceci laissant croire à un autre avantage possible pour l'environnement résultant de la diminution des épandages d'insecticides.

En se basant uniquement sur des estimations de la valeur du rendement, du coût des pesticides, du coût des semences et des droits associés à l'usage de la technologie, le Tableau 27 montre que les petites et grandes exploitations agricoles bénéficient toutes deux d'une augmentation de leurs revenus à l'hectare, malgré les coûts plus élevés des semences et les droits additionnels liés à l'usage de la technologie. Qui plus est, les avantages en termes de revenus indiqués au bas du Tableau 27 peuvent être considérés comme des estimations prudentes, car ils ne tiennent pas compte des avantages associés aux coûts d'épandage, ni de ceux pouvant être associés à la tranquillité d'esprit ou à la plus marge de manœuvre. Dans la mesure où la diminution des coûts d'épandage profite davantage aux petites exploitations qu'aux grandes alors que la plus grande marge de manœuvre profite davantage aux grandes qu'aux petites exploitations, les différences en termes de rendement indiquées au Tableau 27 pourraient augmenter ou diminuer, si ces facteurs étaient pris en considération. Les chiffres indiqués au Tableau 27 montrent cependant que les économies réalisées sur le coût des insecticides chimiques ne suffisent pas à elles seules à compenser le coût plus élevé des graines de coton transgénique résistant aux insectes. L'ampleur de l'augmentation du rendement, résultant de l'application de méthodes de lutte antiparasitaire plus efficaces grâce à l'utilisation de variétés transgéniques résistantes aux insectes, est donc très importante.

Tableau 27 Résumé des avantages financiers (\$ US/hectare) pour les petits et grands agriculteurs d'Afrique du Sud, après l'adoption du coton transgénique résistant aux insectes, en 2004 (adapté de Gouse *et al.*, 2005)

	Small-scale farmer		Large-scale farmer	
	Dryland	Dryland	Dryland	Irrigation
Yield benefits per hectare @US \$0.39/kg	70.52	44.46	44.46	246.53
Reduced pesticides benefit	4.53	16.14	16.14	41.49
Increased seed and technology fee detriment	-23.08	-33.13	-33.13	-59.33
Income advantage	51.97	27.47	27.47	228.68

Les avantages en termes de rendement peuvent cependant varier considérablement d'une saison à l'autre, selon les précipitations et les infestations d'insectes. Les problèmes d'infestation varient toutefois moins dans le cas du coton irrigué, pour lequel les avantages en termes de revenus sont les plus élevés, que du coton produit en aridoculture. En effet, dans le cas du coton produit en aridoculture, il y a des saisons où les infestations par le ver de la capsule du coton sont faibles; ces années-là, les avantages découlant de l'utilisation du coton transgénique résistant aux insectes seraient négligeables. Les données de Gouse *et al.* (2004) pour la saison 1999-2000 indiquent un avantage de plus de 40 % pour les petites exploitations agricoles; cependant, l'analyse initiale des données recueillies par l'institut de recherche français CIRAD, en collaboration avec l'université de Pretoria, pour la région de Makhatini Flats durant la saison sèche de 2002-2003, ne fait état d'aucune différence statistiquement significative sur le rendement (Gouse *et al.*, 2004).

11.D SURVEILLANCE ET SUIVI

Les besoins en matière de surveillance et de suivi sont déterminés au cas par cas. Ce ne sont pas toutes les cultures transgéniques qui doivent faire l'objet d'un suivi après leur approbation et, lorsque la surveillance constitue une condition de l'autorisation, cette

surveillance peut être exigée pour des raisons liées ou non à la sécurité ou des raisons socio-économiques. À titre d'exemple, l'autorisation de produire du coton résistant aux insectes en Afrique du Sud a été assortie d'une condition exigeant le suivi du développement de la résistance des insectes, qui pourrait avoir une incidence économique sur l'utilité de la technologie. Les promoteurs du projet ont confié cette surveillance à un institut de recherche public. Ils ont défini un point de référence pour évaluer la résistance au gène *cryIAC* dans les populations locales d'agrides et ont surveillé la résistance au champ chez les insectes pendant cinq ans. Aucune résistance n'a été observée durant cette étude, ni n'a été signalée par les agriculteurs cultivant cette plante, et l'exigence de surveillance a par la suite été retirée. Pour sa part, le département américain de l'Agriculture (USDA) a mis en place un programme continu de surveillance sur l'usage de pesticides en regard de l'adoption de cultures transgéniques. Ces données sont publiées régulièrement et indiquent comment l'adoption d'une nouvelle technologie modifie les types de pesticides utilisés par les agriculteurs et augmente, ou réduit, leur utilisation selon les caractères introduits dans les plantes transgéniques.

Les techniques de surveillance peuvent être qualitatives ou quantitatives, ainsi que simples ou complexes. Les paramètres de mesure sont déterminés en fonction des objectifs du plan de surveillance, lequel doit tenir compte des éléments suivants : connaissances disponibles sur l'organisme et le milieu récepteur; risques potentiels définis et exigences réglementaires telles que les conditions de gestion des risques assorties au permis de dissémination dans l'environnement. Le plan de surveillance devrait en outre préciser l'intensité du suivi nécessaire ainsi que les méthodes d'analyse appropriées, et prévoir un mécanisme pour l'évaluation continue de l'efficacité du suivi, de manière à pouvoir apporter les modifications qui s'imposent si les conditions devaient évoluer ou si des problèmes imprévus avec la méthodologie se manifestaient (Traynor *et al.*, 2002).

Lorsque les régimes d'échantillonnage prévus sont difficilement applicables, la surveillance permet d'obtenir des observations sur l'impact des organismes transgéniques approuvés après leur dissémination dans l'environnement. Il est cependant difficile de concevoir un programme de surveillance significatif, si les effets sur l'environnement consécutifs à la libération d'un organisme transgénique ne sont que pures conjectures (Traynor *et al.*, 2002). Par ailleurs, la surveillance de vastes zones sur de longues périodes, en utilisant de nombreux sites d'échantillonnage, peut poser des difficultés tant sur le plan technique que celui des ressources disponibles. Lorsque l'EPA a accordé pour la première fois un permis pour la vente de coton Bt résistant aux insectes, elle a exigé du promoteur du projet l'instauration d'un programme pour surveiller la résistance des insectes aux protéines Cry. Après avoir évalué les méthodes utilisées à cette fin par le promoteur, l'EPA a demandé l'utilisation de méthodes plus sensibles afin d'améliorer le dépistage précoce du développement de la résistance dans les populations locales de ravageurs (EPA, 2001)

Les évaluateurs de la biosécurité doivent anticiper et éviter les lacunes potentielles dans les méthodes de surveillance. Ils doivent en comprendre les objectifs et avoir une certaine garantie que des données utiles résulteront de la méthode proposée. Les organismes de réglementation devraient quant à eux s'assurer qu'une stratégie est mise en place pour faire échec à tout impact environnemental indésirable mis en lumière par la surveillance. Enfin, si la surveillance s'inscrit dans un protocole d'alerte rapide visant à détecter tout

impact environnemental indésirable, un mécanisme devrait aussi être prévu pour y réagir en temps opportun (Traynor *et al.*, 2002).

Ces exemples soulèvent des questions importantes au sujet de la surveillance. Premièrement, ce ne sont pas toutes les cultures qui devront faire l'objet d'une surveillance après l'autorisation de leur dissémination en milieux ouverts. Deuxièmement, la surveillance n'est pas toujours justifiée par des questions de sécurité et, troisièmement, elle n'est pas toujours assurée par le promoteur du projet. Dans certains cas, les gouvernements financent des programmes de surveillance et, dans d'autres, la surveillance s'inscrit dans le mandat de recherche publique dans la région ou le pays de dissémination. Quatrièmement, les organismes de réglementation ne peuvent exiger une surveillance que lorsqu'ils ont une idée précise de ce qu'il faut surveiller. Une vague demande de surveiller les "effets non intentionnels" après l'introduction d'une nouvelle culture transgénique n'est pas pratique. Il est tout simplement impossible de concevoir un programme de surveillance sans avoir une idée précise de ce qu'il faut surveiller. Enfin, le programme de surveillance doit évaluer les conséquences d'une action, plutôt que sa probabilité de survenue. Si l'on estime qu'il est très peu probable que l'ADN passe d'un résidu de plante transgénique à un microorganisme terrestre, il n'est guère utile de pousser l'analyse plus loin pour déterminer que cette probabilité est de l'ordre de 10^{-27} . Les évaluateurs du risque veulent déterminer quel impact environnemental pourrait résulter de l'assimilation de l'ADN par les microorganismes terrestres.

CONCLUSIONS

Un grand nombre de modèles utiles et appropriés ont été mis au point pour mener des évaluations du risque qui soient fondées sur des méthodes scientifiques (Tiedje *et al.*, 1989; OCDE, 1993; EFSA, 2006) et conformes aux traités internationaux (CDB et CIPV). En plus de concevoir une méthode d'évaluation pertinente fondée sur la science, les pays doivent aussi déterminer comment tenir compte des intérêts de la société (y compris les intérêts micro- et macro-économiques) dans la prise de décisions et la gestion des risques. Cependant, il n'existe pas de modèle unique à cette fin.

À l'échelle internationale, les normes et les pratiques d'évaluation du risque environnemental associé aux cultures transgéniques sont généralement établies en fonction des préoccupations liées à la sécurité. Il est ainsi généralement reconnu que les dangers potentiels associés à l'introduction d'un nouvel organisme ou d'une nouvelle pratique de production devraient être évalués en regard d'un produit ou d'une pratique déjà existants, ainsi qu'en tenant compte des particularités du caractère introduit, de l'expression phénotypique du nouveau caractère ainsi que des interactions de la plante modifiée avec son milieu récepteur. La qualité de l'évaluation du risque environnemental avant la mise en marché est bien sûr limitée par nos connaissances sur les écosystèmes ainsi que par notre compréhension de la biologie de l'organisme hôte non modifié, y compris ses interactions potentielles à l'intérieur des écosystèmes. À cet égard, il importe d'accroître les recherches menées par le secteur public afin de mieux comprendre les écosystèmes naturels et gérés, autant pour consolider l'évaluation du risque

environnemental avant la mise en marché que pour obtenir des données de référence à l'appui de la surveillance systématique post-commercialisation fondée sur des hypothèses. Cependant les nouvelles technologies moléculaires, et autres technologies issues de toutes ces sciences en "omique" qui sont actuellement proposées, comportent plus d'éléments d'incertitude, car elles n'ont pas encore été validées pour l'évaluation courante des risques. De plus, il est tout aussi important de reconnaître que le retard dans l'adoption de certaines technologies, en attendant l'acquisition de nouvelles connaissances, n'est pas dépourvu de risque.

L'expérience acquise sur plus de dix ans de production de cultures transgéniques nous a permis de mieux nous familiariser avec certains produits, quant aux exigences relatives aux essais sur le terrain, à l'importation et à la production. Il paraît raisonnable d'utiliser cette expérience dans le cadre d'une analyse rétrospective, pour établir une distinction entre les risques. Ainsi, les combinaisons caractères-cultures qui s'appuient sur de nombreuses années d'utilisation sans danger devraient être examinées différemment des matériaux transgéniques expérimentaux. De même, les risques associés à l'importation de cultures vivrières et fourragères transgéniques devraient être évalués d'une manière adéquate qui tienne compte du niveau d'exposition, alors que les essais au champ devraient prévoir des méthodes adéquates de gestion du risque (confinement). Enfin, la surveillance post-commercialisation peut être un exercice utile et valable, lorsqu'elle s'appuie sur les résultats de l'évaluation du risque. Cependant, des objectifs et des critères de surveillance mal définis pourraient mener à une mauvaise caractérisation du risque ou à un faux sentiment de sécurité.

Sans doute la plus grande incertitude quant à l'évolution future du processus de décisions réglementaires concernant les cultures transgéniques apparaît lorsqu'on compare les principes d'évaluation du risque environnemental selon l'OCDE, le Protocole de Cartagena et la CIPV – trois instruments qui diffèrent quant à leur traitement des autres considérations. Ainsi, les autres considérations ne sont pas prises en compte expressément dans l'évaluation du risque selon l'OCDE, bien qu'on présume qu'elles influent dans une certaine mesure sur la prise de décisions ultime. Le Protocole de Cartagena définit officiellement l'importance des préoccupations socioéconomiques, sans toutefois indiquer de façon précise comment et dans quelle mesure ces autres considérations devraient être intégrées à la prise de décisions sur la biosécurité. Enfin, la CIPV propose une incorporation plus officielle des aspects économiques (mais non sociaux) dans l'analyse des risques associés aux ravageurs.

Comme en témoigne le débat public en Europe, une évaluation du risque rigoureuse fondée sur la science constitue une condition nécessaire, mais non suffisante, pour assurer l'acceptation sociale des biotechnologies agricoles. Dans le cadre du processus décisionnel, les préoccupations non liées à la sécurité peuvent influencer largement l'acceptation par le public et, de ce fait, la prise de décisions réglementaires. Un défi pour les gouvernements est donc de déterminer quel serait le meilleur moyen d'intégrer ces questions dans leur cadre juridique et réglementaire, tout en respectant leurs obligations en vertu d'autres accords internationaux. Tout mouvement en faveur d'une évaluation plus complète du risque basée sur une analyse coûts-avantages, avant d'autoriser l'introduction de cultures transgéniques, prendra du temps et nécessitera la conduite d'autres recherches pour définir les indicateurs économiques pertinents devant servir à l'évaluation des impacts environnementaux. Enfin, si l'on veut inclure les incidences

socio-économiques potentielles dans l'évaluation du risque environnemental, l'honnêteté intellectuelle exigerait que l'on tienne compte autant des incidences positives que négatives.

RÉFÉRENCES

1. Adang, M.J., Staver, M.J., Rocheleau, T.A., Leighton, J., Barker, R.F., Thompson, D.V. (1985). Characterised full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* **36**: 289-300.
2. AOSA. (2000). AOSA rules for testing seeds. Association of Official Seed Analysts (AOSA), Lincoln, Nebraska.
3. Arencibia, A.D., Carmona, E.R., Tellez, P., Chan, M.T. Yu, S.M., Trujillo, L.E. and Oramas, P. (1998). An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research* **7**: 1-10.
4. Aronson, A.I., Backman, W. and Dunn, P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiological Reviews* **50**: 1-24.
5. Astwood, J.D. and Fuchs, R.L. (1996). Food allergens are stable to digestion in a simple model of the gastrointestinal tract. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **97**: 241.
6. Astwood, J.D. and Fuchs, R.L. (2000). Status and safety of biotech crops. In: Baker D.R. and Umetsu, N.K. (Eds.). *Agrochemical Discovery Insect, Weed and Fungal Control*. ACS Symposium Series 774, pp 152-164.
7. Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. and Schaller, H. (1982). Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* **19**: 327-336.
8. Bell, A.A. (1999). Diseases of cotton. In: Smith, W.C., Cothren, J.T. (Eds.). *Cotton: Origin, History, Technology and Production*. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA, pp 553-593.
9. Berkey, D.A., Savoy, B.R., Miller S.R. and Johnson, P.G. (2002). Pollen dissemination from adjacent field of genetically enhanced cotton in the Mississippi delta. Proceedings of the Beltwide Cotton Conference, Atlanta, GA. National Cotton Council of America, Memphis, TN.
10. Betz, F.S., Hammond, B.G. and Fuchs, R.L. (2000). Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **32**: 156-173.
11. Bevan, M.W., Flavell, R.E. and Chilton, M.D. (1983). A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* **304**: 184-187.
12. Bingen, J. and Busch, L. (2006). Cotton in West Africa: a question of quality. In: *The Shape of the Global Food and Fiber System*. Springer Netherlands, pp 219-242.

13. BIO. (2006). Compliance Education Manual: Confined Field Trials of Regulated Genetically Engineered Cotton in the United States. Biotechnology Industry Organization (BIO), Washington, D.C., USA, 112 pp.
14. Birch, R.G. (1997). Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 297-326.
15. Bolivar, F., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Shine, J., Rodriguez, R.L. and Boyer H.W. (1977). Origin of replication of pBR345 plasmid DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74(12)**: 5265-9.
16. Bookout, J.T., Hamilton, A. and Loretta, R.A.P. (2001). Demonstration of the presence of the Cry2Ab2 protein produced in multiple generations of Bollgard II® cotton event 15985. Report No. MSL-17112, Study 01-01-36-01, Monsanto Company, St. Louis, Missouri, USA.
17. Bowden, J. (1973). Migration of pests in the tropics. *Medelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* **38**: 785-796.
18. Brookes, G. and Barfoot, P. (2006). GM Crops: The First Ten Years - Global Socio-Economic and Environmental Impacts. ISAAA Brief No. 36. ISAAA: Ithaca, NY.
19. Brown, A.H.D., Brubaker, C.L., Kilby, M.J. (1997). Assessing the risk of cotton transgene escape into wild Australian *Gossypium* species. In: McLean, G.D., Waterhouse, P.M., Evans, G., and Gibbs, M.J. (Eds.). Commercialisation of Transgenic Crops: Risk, Benefit and Trade Considerations. Bureau of Resource Sciences, Canberra, Australia, pp 83-93.
20. Brubaker, C.L.; Bourland, F.M. and Wendel, J.F. (1999). In: Smith, W.C., Cothren, J.T. (Eds.). Cotton: Origin, History, Technology and Production. John Wiley and Sons, Inc, New York, USA, pp 3-32.
21. Cantwell, G.E., Lehnert, T. and Fowler, J. (1972). Are biological insecticides harmful to the honey bees? *American Bee Journal* **112**: 294-296.
22. CBD. (2000). Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity: text and annexes. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal. [Online] Retrieved 26 September 2003, from: <http://www.biodiv.org/biosafety/protocol.asp>
23. Chart, H., Smith, H.R., La Ragione, R.M. and Woodward, M.J. (2000). An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5 α and EQ1. *Journal of Applied Microbiology* **89(6)**: 1048–1058.
24. Chauhan, D.S., Singh, P. and Singh, P. (1983). Isolation distance in upland cotton under Nagpur conditions. *Cotton Development* **13**: 23.
25. Cheng, M, Fry, J.E., Pang, S.Z., Zhou, H.P., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Conner, W. and Wan, Y.C. (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* **115**: 971-980.

26. Cheng, XY, Sardana, R., Kaplan, H. and Altosaar, I. (1998). *Agrobacterium*-transformed rice expressing synthetic *cryIAb* and *cryIAc* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 2767-2772.
27. Cooley, J., Ford, T. and Christou, P. (1995). Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plants produced by electric-discharge particle acceleration. *Theoretical Applied Genetics* **90**: 97-104.
28. Crecchio, C. and Stotzky, G. (1998). Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biology and Biochemistry* **30**: 463-470.
29. Depicker A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. and Goodman, H. M. (1982). Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* **1**: 561-573.
30. Dulmage, H.T. (1981). In: Burges, H.D. (Ed.). *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Academic Press, London, England, pp 193-222.
31. Duviard D. (1981). *Les Dysdercus du Cotonnier en Afrique Occidentale*. Ecologie et Migrations Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, Paris.
32. Eastick, R.J. and Hearnden, M.N. (2006). Potential for weediness of Bt cotton in northern Australia. *Weed Science*, **54(6)**: 1142-1151.
33. EFSA. (2006). Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. *EFSA Journal* (2006) **99**: 1-100. http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/press_room/publications/scientific/1497.Par.0005.File.dat/gmo_guidance%20gm%20plants_en.pdf
34. Elfawal, M.A., Bishr, M.A., Hassoub, E.K. (1976). Natural cross pollination in Egyptian cotton (*Gossypium barbadense* L.). *Journal of Agricultural Science* **86**: 205-209.
35. English, L. and Slatin, S.L. (1992). Mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: A comparison with other bacterial toxins. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **22(1)**: 1-7.
36. Enríquez-Obregón, G.A., Vázquez-Padrón, R.I., Prieto-Samsónov, D.L., Pérez, M. and Selman-Housein, G. (1997). Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidant compounds. *Biotecnología Aplicada* **14**: 169-174.
37. Enríquez-Obregón, G.A., Vázquez-Padrón, R.I., Prieto-Sansonov, D.L., de la Riva, G.A. and Selman-Housein, G. (1998). Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Planta* **206**: 20-27.
38. EPA. (1988). Guidance for the Registration of Pesticide Products Containing *Bacillus thuringiensis* as an Active Ingredient. NTIS PB 89-164198.
39. EPA. (2001). *Bacillus thuringiensis* (Bt) Plant-Incorporated Protectants. Biopesticides Registration Action Document. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Biopesticides and Pollution Prevention Division. http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/pips/bt_brad.htm

40. Fagard, M. and Vaucheret, H. (2000). (Trans) gene silencing in plants: How many mechanisms? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 167-194.
41. FAO. (2004). ISPM No. 11 (2004) Pest risk analysis for quarantine pests including analysis of environmental risks and living modified organisms. Food and Agricultural Organization (FAO), Rome, Italy. <https://www.ippc.int/servlet/CDSServlet?status=ND0xMzM5OS4zNDE2MyY2PWVuJmZPXB1YmXpY2F0aW9ucyZzaG93Q2hpbGRyZW49dHJ1ZSYzNz1pbmZv#koinfo>
42. Flexner, J.L., Lighthart, B. and Croft, B.A. (1986). The effects of microbial pesticides on non-target beneficial arthropods. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **16**: 203-254.
43. Fling, M.E., Kopf, J. and Richards, C. (1985). Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3^l-(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* **13(19)**: 7095-7106.
44. Folger, K.R., Wong, E.A., Wahl, G. and Capecchi, M.R. (1982). Patterns of Integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: Evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Molecular and Cellular Biology* **2(11)**: 1372-1387.
45. 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. and Woo, S.C. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80**: 4801-4807.
46. Fuchs, R.L. and Astwood, J.D. (1996). Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. *Food Technology* **50**: 83-88.
47. Fuchs, R.L., Ream, J.E., Hammond, B.G., Naylor, M.W., Leimgruber, R.M. and Berberich, S.A. (1993). Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. *Bio/Technology* **11**: 1543-1547.
48. Gardner, R.C., Howarth, A.J., Hahn, P., Brown-Luedi, M., Shepherd, R.J., and Messing, J. (1981). The complete nucleotide sequence of an infectious clone of cauliflower mosaic virus by M13mp7 shotgun sequencing. *Nucleic Acids Research* **9(12)**: 2871-2888.
49. Gelvin, S.B. (1998). The introduction and expression of transgenes in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **9**: 227-232.
50. Gilissen, L.J.W., Metz, P.L.J., Stiekema, W.J. and Nap, J.-P. (1998). Biosafety of *E.coli* β -glucuronidase (GUS) in plants. *Transgenic Research* **7**: 157-163.
51. Gouse, M., Pray, C., and Schimmelpfennig, D. (2004). The distribution of benefits from Bt cotton adoption in South Africa. *AgBioForum* **7(4)**: 187-194. <http://www.agbioforum.org/v7n4/index.htm>.
52. Govila, O.P. and Rao, C.H. (1969). Studies on the *in vitro* germination and storage of cotton pollen. *Journal of Palynology* **5**: 37-41.
53. Gridley, H.E. (1974). Natural and artificial crossing in upland cotton at Namulongu, Uganda. *Cotton Growing Review* **51**: 149-152.

54. Hellanäs, K-E., Branzell, C., Johnsson, H. and Slanina, P. (1995). High levels of glycoalkaloids in the established Swedish potato variety Magnum Bonum. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **68**: 249-255.
55. Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and 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.
56. Hill, R., Johnston, S. and Sendashonga, C. (2004). Risk assessment and precaution in the biosafety protocol. *Review of European Community and International Environmental Law (RECIEL)* **13(3)**: 263-269.
57. Hodal, L., Bocharadt, A., Neilsen, J.E., Mattesson, O. and Okk, F.T. (1992). Detection, expression and specific elimination of endogenous β -glucuronidase activity in transgenic and non-transgenic plants. *Plant Science* **87**: 115-122.
58. Hofmann, C., Lüthy, P., Hutter, R. and Pliska, V. (1988b). Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *European Journal of Biochemistry* **173**: 85-91.
59. Hofmann, C., Vanderbruggen, H. V., Hofte, H., Van Rie, J. , Jansens, S. and Van Mellaert, H. (1988a). Specificity of *B. thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **85**: 7844-7848.
60. Hokanson, K., Heron, D., Gupta, S., Koehler, S., Roseland, C., Shantharam, S., Turner, J., White, J., Schechtman, M., McCammon, S. and Bech, R. (1999). The concept of familiarity and pest resistant plants. *In: Traynor, P.L., and Westwood, J.H. (Eds.). Proceedings of a Workshop on: Ecological Effects of Pest Resistance Genes in Managed Ecosystems. Information Systems for Biotechnology, Blacksburg, VA, USA, pp 15-19.*
61. Hooykaas, P.J.J. and Shilperoort, R.A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* **19**: 15-38.
62. Hu, C.Y., Chee, P.P., Chesney, R.H., Zhou, J.H., Miller, P.D. and O'Brien, W.T. (1990). Intrinsic GUS-like activities in seed plants. *Plant Cell Reports* **9**: 1-5.
63. Hussein, K., Perret, C., Hitimana, L. (2005). Economic and social importance of cotton production and trade in West Africa: Role of cotton in livelihoods, national & regional development and trade. Sahel and West Africa Club (SWAC) Secretariat / OECD. Draft for discussion and comment. http://www.livelihoods.org/hot_topics/docs/AG_Cotton.doc
64. ICAC. (2003). Assessment of the Impact and Main Dynamics of Cotton Diseases Affecting in Particular Small-Scale Production Systems in Southern and Eastern Africa. International Cotton Advisory Council (ICAC), South East African Cotton Forum, Washington, DC, USA. http://www.icac.org/projects/CommonFund/seacf_disease/proj_11_final.pdf
65. Ignoffo, CM. (1973). Effects of entomopathogens on vertebrates. *Annals of the New York Academy of Sciences* **217**: 144-172.

66. IPCS. (1999). International Programme on Chemical Safety - Environmental Health Criteria 217: Microbial Pest Control Agent *Bacillus thuringiensis*. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp 1-82. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc217.htm>
67. IPCS. (2004). International Programme on Chemical Safety - Risk Assessment Terminology. IPCS Harmonization Project Document No. 1. International Program on Chemical Safety. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 122 pp.
68. Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. (1996). High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* **4**: 745-750.
69. Jackson, R.E., Bradley, Jr., J.R., Burd, A.D. and Van Duyn, J.W. (2000). Field and greenhouse performance of bollworm on Bollgard II genotypes. *Proceedings 2000 Beltwide Cotton Conferences, Volume 2*: 1048-1051.
70. Jefferson, R.A., Kavenagh, T.A. and Bevan, M.W. (1986). β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **83**: 8447-8451.
71. Jefferson, R.A., Kavenagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987). GUS fusion: β -D-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* **6(13)**: 3901-3907.
72. Jenkins, J.N. (1992). Cotton. In: Traditional Crop Breeding Practices: An Historical Review to Serve as a Baseline for Assessing the Role of Modern Microbiology. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Paris, France, pp 61-70. <http://www.oecd.org/dataoecd/57/48/1946204.pdf>
73. John, M.E. (1997). Cotton crop improvement through genetic engineering. *Critical Reviews in Biotechnology* **17(3)**: 185-208.
74. Kay, R., Chan, A., Daly, M. and McPherson, J. (1987). Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **236**: 1299-1302.
75. Keeler, K.H. (1985). Implications of weed genetics and ecology for the deliberate release of genetically engineered crop plants. *Recombinant DNA Technical Bulletin* **8**: 165-172.
76. Keeler, K.H. (1989). Can genetically engineered crops become weeds? *Biotechnology* **7**: 1134-1139.
77. Klausner, A. (1984). Microbial insect control. *Bio/Technology* **2**: 408-419.
78. Kononov, M.E., Bassuner, B. and 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.
79. Koskella, J. and Stotzky, G. (1997). Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. *Applied and Environmental Microbiology* **63(9)**: 3561-3568.

80. Krattiger A.F. (1997). Insect resistance to crops: A case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries. *ISAAA Briefs* **2**.
81. Krieg, A. and Langenbruch, G.A. (1981). Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In: Burges, H.D. (Ed.). *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*, Academic Press, London, England, pp 837-896.
82. Kuhnert, P., Hacker, J., Mühldorfer, I., Burnens, A.P., Nicolet, J. and Frey, J. (1997). Detection system for *Escherichia coli*-specific virulence genes: absence of virulence determinants in B and C strains. *Applied and Environmental Microbiology* **63(2)**: 703-709.
83. Lazarides, M., Cowley, K. Hohnen, P. (1997). *CSIRO Handbook of Australian Weeds*. CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia.
84. Lilley, M., Ruffell, R.N. and Somerville, H.J. (1980). Purification of the insecticidal toxin in crystals of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of General Microbiology* **118**: 1-11.
85. Llewellyn, D. and Fitt, G. (1996). Pollen dispersal from two field trials of transgenic cotton in the Namoi Valley, Australia. *Molecular Breeding* **2**: 157-166.
86. Macfarlane, T.D., Watson, L. and Marchant, N.G. (2002). *Florabase: the Western Australian Flora*. Western Australian Herbarium, Department of Conservation and Land Management, Government of Western Australia. <http://florabase.calm.wa.gov.au>
87. MacIntosh, S.C., Stone, T.B., Sims, S.R., Hunst, P.L., Greenplate, J.T., Marrone, P.G., Perlak, F.J., Fischhoff, D.A. and Fuchs, R.L. (1990). Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *Journal of Invertebrate Pathology* **56**: 258-266.
88. Mahaffey, J.S., Howard, K.D., Kerby, T.A., Burgess, J.C., Casavechia, M. and Coskrey, A. (2000). The agronomic performance of one Bollgard II donor variety. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference 2*: 1068. National Cotton Council, Memphis. TN.
89. Matthews, G.A. and Tunstall, J.P. (1994). *Insect Pests of Cotton*. CAB. International, Wallingford, England, 592 pp.
90. Matzke, A.J.M. and Matzke, M.A. (1998). Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 142-148.
91. May, G.D., Afza, R., Mason, H.S., Wiecko, A., Novak, F.J. and Arntzen, C.J. (1995). Generations of transgenic Banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biotechnology* **13**: 486-492.
92. McGregor, S.E. (1976). *Insect pollination of cultivated crop plants*. Agricultural Handbook No. 496, United States Department of Agricultural Research Service.
93. Mendelsohn, M., Kough, J., Vaituzis, Z. and Matthews, K. (2003). Are Bt crops safe? *Nature Biotechnology* **21(9)**: 1003-1009.
94. Meredith, W.R.J. and Bridge, R.R. (1973). Natural crossing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Crop Science* **13**: 551-552.

95. Moffett, J.O., Stith, L.S., Burkhardt, C.C. and Shipman, C.W. (1976). Fluctuation of wild bee and wasp visits to cotton flowers. *Arizona Academy of Science* **11**: 64-68.
96. Moffett, J.O., Stith, L.S., Burkhardt, C.C. and Shipman, C.W. (1975). Honey bee visits to cotton flowers. *Environmental Entomology* **4**: 203-206.
97. Moresco, E. R., Farias, F. J. C., Aguiar, P. H., Griodi-Papp, I. I., Freire, E. C., Marques, M. F., and de Souza, M. C. (1999). Determination of the rate of allogamy in herbaceous cotton in the cerrado of Mato Grosso. *In: Anais II Congresso brasileiro de Algodao: O algodao no seculo XX perspectivas para o seculo XXI*, Ribeirao Preto, SP Brasil.
98. NAS. (1987). Introduction of recombinant DNA-engineered organisms into the environment: Key issues. National Academy of Sciences, Washington, D.C., 24 pp.
99. Nibouche S. (1994). Cycle évolutif de *Helicoverpa armigera* (Hübner1808) (Lepidoptera Noctuidae) dans l'ouest du Burkina Faso. Doctoral thesis, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.
100. Niles, G.A. and Feaster, C.V. (1984). Cotton. *In: Kohel, R.J. and Lewis, C.F. (Eds.). Cotton. Agronomy 24. Soil Society of America, Inc., Wisconsin, USA.*
101. NRC. (1983). Risk assessment in the Federal Government: Managing the Process. National Research Council, National Academy Press, Washington D.C., 124 pp.
102. NRC. (1989). Field Testing Genetically Modified Organisms: Framework for Decisions. Committee on Scientific Evaluation of the Introduction of Genetically Modified Microorganisms and Plants into the Environment, National Research Council. National Academy Press, Washington.D.C., 170 pp.
103. NRC. (1996). Understanding Risk – Informing Decisions in a Democratic Society. Committee on Risk Characterization, Commission on Behavioral and Social Sciences and Education, National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C., 250 pp.
104. Odell, J.F., 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.
105. OECD. (1993). Safety Considerations for Biotechnology: Scale-up of Crop Plants. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Paris France. 43 pp. <http://www.oecd.org/dataoecd/26/26/1958527.pdf>
106. OECD. (1995). Report of the OECD Workshop on Environmental Hazard/Risk Assessment. OECD Environment Monographs No. 105. Paris, France.
107. OECD. (2000). Report of the Working Group on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology. Report C(2000)86/ADD2. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Paris, France. 65 pp.
108. OGTR. (2002). The Biology and Ecology of Cotton (*Gossypium hirsutum*) in Australia. Office of the Gene Technology Regulator (OGTR), Canberra, Australia. <http://www.ogtr.gov.au/pdf/ir/biologycotton.pdf>

109. OGTR. (2005). Risk Analysis Framework. Australian Government, Department of Health and Aging. Office of the Gene Technology Regulator. 118 pp. <http://www.ogtr.gov.au/pdf/public/raffinal2.2.pdf>
110. Oosterhuis, D.M., Jernstedt, J. (1999). Morphology and anatomy of the cotton plant. In: Smith, W.C., Cothren, J.T. (Eds.). Cotton: Origin, History, Technology and Production. John Wiley and Sons, Inc, New York, USA, pp 175-206.
111. Oshima, A., Kyle, J.W., Miller, R.D., Hoffmann, J.W., Powell, P.P., Grubb, J.H., Sly, W.S., Tropak, M. Guise, K.S. and Gravel, R.A. (1987). Cloning, sequencing and expression of cDNA for human β -glucuronidase. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **84**: 685-689.
112. Palm, C.J., Donegan, K.K., Harris, D., and Seidler, R.J. (1994). Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin from transgenic plants. *Molecular Ecology* **3**: 145-151.
113. Palm, C.J., Schaller, D.L., Donegan, K.K. and Seidler, R.J. (1996). Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin. *Canadian Journal of Microbiology* **42**: 1258-1262.
114. Palm, C.J., Seidler, R.J., Donegan, K.K. and Harris, D. (1993). Transgenic plant pesticides: Fate and persistence in soil. *Plant Physiology Supplement* **102**: 166.
115. Percival, A.E.; Wendel, J.F. and Stewart, J.M. (1999). Taxonomy and germplasm resources. In: Smith, W.C., Cothren, J.T. (Eds.), Cotton: Origin, History, Technology and Production. John Wiley and Sons, Inc, New York, USA, pp 33-64.
116. Pineda, N.A.G., Mattock, D.E.W., Cavetto, T.A. and Loretta, R.A.P. (2002). PCR and DNA sequence analysis of the insert in Bollgard II® cotton event 15985. Report No. MSL-17146, Monsanto Company, St. Louis, Missouri, USA.
117. Powlowski, W.P. and Somers, D.A. (1996). Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. *Molecular Biotechnology* **6**: 17-30.
118. Powlowski, W.P. and Somers, D.A. (1998). Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **95**: 12106-12110.
119. Pyke, B.A. and Brown, E.H. (2000). The Cotton Pest and Beneficial Guide. Cotton Research and Development Corporation, New South Wales, Australia.
120. Ramanathan, V. and 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.
121. Rao, G.M., Nadre, K.R. and Suryanarayana, M.C. (1996). Studies on the utility of honey bees on production of foundation seed of cotton cv. NCMHH-20. *Indian Bee Journal* **58**: 13-15.

122. Rohan (1990) in Powlowski, W.P. and Somers, D.A. (1996). Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. *Molecular Biotechnology* **6**: 17-30.
123. Salyers, A. (1997). Horizontal gene transfer between prokaryotes. Nordic Seminar on Antibiotic Resistance Marker Genes and Transgenic Plants, p. 8-16, and p. 43-57. June 12-13, 1997, Oslo, Norway. The Norwegian Biotechnology Advisory Board.
124. Sanders, J.H., Abdoulaye, T. and Cabanilla, L.S. (2005). Economic cost of non-adoption of Bt-cotton in West Africa: with special reference to Mali. *International Journal of Biotechnology* **7(1/2/3)**: 46-61.
125. Sanders, P.R., Winter, J.A., Barnason, A.R., Rogers, S.G. and Fraley, R.T. (1987). Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Research* **15(4)**: 1543-1558.
126. Schuler, M.A., Schmitt, E.S., Beachy, R.N. (1982). Closely related families of genes code for the alpha and alpha' subunits of the soybean 7S storage protein complex. *Nucleic Acid Research* **10**: 8225-8261.
127. Schulz, M. and Weissenbock, G. (1987). Dynamics of the tissue specific metabolism of luteolin glucuronides in the mesophyll or rye primary leaves (*Secale cereale*). *Zeitschrift für Naturforschung C* **43c**: 187-193.
128. Seelanan, T., Schnabel, A., Wendel, J.F. (1997). Congruence and consensus in the cotton tribe (Malvaceae). *Systematic Botany* **22**: 259-290.
129. Serdy, F.S., Berberich, S., and Sharota, E. (1995). Petition for determination of nonregulated status Bollgard® cotton lines 757 and 7076 (*Gossypium hirsutum* L.) with the gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Monsanto Company, St. Louis, Mo, USA.
130. Sere, A. (2007). Synthèse des principaux resultants acquis sur le coton transgenique Bt au Burkina Faso. *Biotech Echo*. **7**: 1-4.
131. Shaddock, J.A. (1983). Some observations on the safety evaluation of nonviral microbial pesticides. *Bulletin of the World Health Organization* **61**: 117-128.
132. Shappley, Z. (2002). Independent inheritance data for cotton insect control events 531 (*CryIAc*) and 15985 (*Cry2Ab2*) in two elite backgrounds. Monsanto Company, St. Louis, Missouri, USA.
133. Shaw, A.J. and Watson, C.R. (2000). Cotton Pest Management Guide 2000/2001. Australian Cotton Cooperative Research Centre, New South Wales, Australia.
134. Siegel, J.P. and Shaddock, J.A (1989). Safety of microbial insecticides to vertebrates - humans. *In: Safety of Microbial Insecticides*. CRC Press, Inc., Florida, U.S.A., pp 101-114.
135. Sindel, B.M. (1997). Out-crossing of transgenes to weedy relatives. *In: McLean, G. D, Waterhouse, P. M., Evans, G., and Gibbs, M. J. (Eds.). Proceeding of Commercialisation of Transgenic Crops: Risk, Benefit and Trade Considerations,*

- Department of Primary Industry and Energy; Bureau of Resource Sciences, Canberra, Australia, pp 43-81.
136. Smith, W.C. (1976). Natural cross-pollination of cotton. *Arkansas Farm Research* **25**: 6.
 137. Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**: 503-517.
 138. Stalker, D.M., Thomas, C.M. and Donald R. Helinski, D.R. (1981). Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and General Genetics* **181(1)**: 8-12.
 139. Sutcliffe, J.G. (1978). Nucleotide sequence of the ampicillin resistance Gene of *Escherichia coli* plasmid pBR32. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **75(8)**: 3737-3741.
 140. Swartz, J.R. (1996). *Escherichia coli* recombinant DNA technology. In: Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B, Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger, H.E. (Eds.). *Escherichia coli* and Salmonella: Cellular and Molecular Biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C., pp 1693-1711.
 141. Tapp, H., and Stotzky, G. (1995). Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. *Applied and Environmental Microbiology* **61(5)**: 1786-1790.
 142. Tapp, H., and Stotzky, G. (1998). Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **30**: 471-476.
 143. Tapp, H., Calamai, L. and Stotzky, G. (1994). Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay minerals. *Soil Biology and Biochemistry* **26**: 663-679.
 144. Tempe, J. and Schell, J. (1977). In: A.B. Legocki (Ed.). Translation of Natural and Synthetic Polynucleotides. Poznan University of Agriculture, Poznan, Poland, 416 pp.
 145. Theron, C.C. and van Staden, W.H. (1975). Natural cross pollination of cotton at Uptington (Natuurlike kruisbestuiving van katoen te Uptington). *Agroplanta* **7**: 91-92.
 146. Tiedje, J., Colwell, R., Grossman, Y., Hodson, R., Lenski, R., Mack, R. and Regal, P. (1989). The planned introduction of genetically modified organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology* **70(2)**: 298-315.
 147. Traynor, P, Frederick, R. and Koch, M. (2002). Biosafety and risk assessment in agricultural biotechnology. The Agricultural Biotechnology Support Project (ABSP), Institute of International Agriculture, Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA. http://www.iaa.msu.edu/absp/biosafety_workbook.html
 148. Umbeck, P., Barton, K.A., Norheim, E.V., McCarty, J.C., Parrot, W.L. and Jennings, J.C. (1991). Degree of pollen dispersal by insects from a field test of genetically engineered cotton. *Journal of Economic Entomology* **84**: 1943-1950.

149. United States Pharmacopoeia (1995). United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville, Md., Volume XXII. 2053 pp.
150. US EPA. (1988). Guidance for the re-registration of pesticide products containing *Bacillus thuringiensis* as the active ingredient. NTIS PB 89-164198.
151. US EPA. (1998). R.E.D. Facts: *Bacillus thuringiensis*. EPA 738-F-98-001. <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets/0247fact.pdf>
152. USDA. (1995). USDA/APHIS determination on a petition 94-308-01p of Monsanto Agricultural Company seeking nonregulated status of Lepidopteran-resistant cotton lines 531, 757, 1076: Environmental assessment and finding of no significant impact.
153. Van Rie, J., Jansens, S. Hofte, H., Degheele, D. and Van Mellaert, H. (1989). Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins, importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *European Journal of Biochemistry* **186**: 239-247.
154. Van Rie, J., Jansens, S., Hofte, H., Degheele, D. and Van Mellaert, H. (1990). Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Applied Environmental Microbiology* **56**: 1378-1385.
155. Venkateswerlu, G. and Stotzky, G. (1992). Binding of the protoxin and toxin proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on clay minerals. *Current Microbiology* **25**: 225-233.
156. Vinson, S.B. (1989). Potential impact of microbial insecticides on beneficial arthropods in the terrestrial environment. In: Laird, M., Lacey, L.A. and Davidson, E.W. (Eds.). Safety of Microbial Insecticides. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, pp 43-64.
157. Vollesen, K. (1987). Native species of *Gossypium* (Malvaceae) in Africa, Arabia, and Pakistan. *Kew Bulletin* **42**: 337-349.
158. Wang, C.C., and Touster, O. (1972). Studies of catalysis by β -Glucuronidase: the effect of structure on the rate of hydrolysis of substituted phenyl β -D-glucopyranosiduronic acids. *Journal of Biological Chemistry* **247**: 2650-2656.
159. Watson, L. and Dallwitz, M.J. (1992). The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. Version: 14th December 2000. University of New Orleans, USA. <http://delta-intkey.com/angio/www/index.htm>
160. Wenck, A., Czako, M., Kanevski, I. and 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.
161. Wendel J.F. and Cronn, R.C. (2003). Polyploidy and the evolutionary history of cotton. In: Sparks D. (Ed.). Advances in Agronomy, Vol. 78. Academic Press, New York, USA.
162. Wendel, J.F. and Albert, V.A. (1992). Phylogenetics of the cotton genus (*Gossypium*): Character-state weighted parsimony analysis of chloroplast DNA

- restriction site data and its systematic and biogeographic implications. *Systematic Botany* **17**: 115-143.
163. Whitely, H.R. and Schnepf, H.E. (1986). The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Microbiology* **40**: 549-576.
164. Wolfersberger, M.G., Hofmann, C. and Luthy, P. (1986). Interaction of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin with membrane vesicles isolated from lepidopteran larval midgut. In: Falmagne, P., Fehrenbech, F.J., Jeljaszewics, J. and Thelestam (Eds.). *Bacterial Protein Toxins*. Lubrecht & Cramer, New York, New York, USA, pp 237-238.
165. Wozniak, C.A. and Owens, L.D. (1994). Native β -glucuronidase activity in sugarbeet (*Beta vulgaris*). *Physiologia Plantarum* **90**: 763-771.
166. Zitnak, A. and Johnston, G.R. (1970). Glycoalkaloid content of B5141-6 potatoes. *American Potato Journal* **47**: 256-260.