

SOCIETE BIOGEMMA

Demande d'autorisation auprès de la Commission d'Etude de la
Dissémination des Produits issus du Génie Biomoléculaire

**Essai au champ d'un maïs mâle-stérile et
évaluation d'un système d'élimination de gène de sélection
(demande pluriannuelle)**

BIOGEMMA S.A.S.
5, rue Saint-Germain l'Auxerrois
75001 PARIS
avril 2002

PREAMBULE

Cette demande d'expérimentation est déposée dans le cadre de la réglementation européenne décrite dans la directive 90/220/CEE, transposée en droit français par la loi du 13 juillet 1992. Cette directive a été modifiée le 21 avril 2001 et est en voie d'être remplacée par la directive 2001/18/CE.

Ces textes régissent la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés, que ce soit à des fins de mise en marché ou à d'autres fins et notamment à des fins de recherche.

La demande qui fait l'objet de ce dossier concerne un essai dont les résultats attendus doivent permettre de valider une hypothèse (« preuve de concept »). Il s'agit d'un premier essai en champ pour ces événements de transformation ; il fait suite à de nombreuses expérimentations en serre. Il permettra de confirmer, dans les conditions agronomiques normales, le bon fonctionnement du caractère modifié et d'évaluer le système d'élimination de gène marqueur que nous souhaitons utiliser par la suite.

Conformément aux termes de la directive 2001/18, l'importance de la dissémination et les conditions de son déroulement prennent en compte le stade de développement du projet et l'information scientifique disponible. S'agissant d'un projet nouveau, les plantes ont été caractérisées par des études moléculaires ; la stabilité d'expression des caractères introduits dans les plantes a été observée durant plusieurs générations en serre.

SOMMAIRE

Introduction	5
A. Informations administratives générales	9
A.1 Nom et adresse du notifiant	9
A.2 Qualification et expérience du responsable scientifique	9
A.3. Titre du projet	9
A.4. Développements ultérieurs envisagés	9
B. Caractéristique biologique de l'espèce végétale réceptrice	9
B.1 Position taxonomique	9
B.2 Mode de reproduction et compatibilité sexuelle avec la flore	10
B.2a Information concernant la reproduction du maïs	10
B.2b Compatibilité sexuelles avec d'autres espèces sauvages ou cultivées	10
B.3 Capacité de survie	10
B.3a Capacité à former des structures de survie ou de dormance	10
B.3b Facteurs spécifiques affectant la capacité de survie	11
B.4 Dissémination	11
B.5 Distribution géographique de la plante	11
B.6 Description de l'habitat naturel de la plante	11
B.7 Interactions avec des organismes autres que les plantes	11
C. Transformation génétique des plantes	11
C.1 Méthode de transformation	12
C.2 Nature et source des vecteurs utilisés	12
C.3 Taille, origine et fonction voulue de chaque fragment constituant de la région envisagée pour le transfert	12
D. Le matériel transgénique	12
D.1 Traits et caractéristiques introduits	12
D.2 Informations sur les séquences réellement transférées	12
D.3 Informations concernant l'expression de l'insert	13
D.4 Description des différences entre la plante supérieure génétiquement modifiée et la plante réceptrice	13
D.5 Stabilité génétique des inserts	13
D.6 Possibilité de transfert de matériel génétique des plantes génétiquement modifiées dans d'autres organismes	13
D.7 Toxicité ou effet nocif pour la santé publique et l'environnement de la modification apportée	14
D.8 Interactions significative avec des organismes non-cibles	14
D.9 Description des méthodes de détection et d'identification de l'OGM	14
D.10 Historique des précédentes disséminations	14
E. Caractérisation du site de dissémination	15
E.1 Localisation et étendue du site de dissémination	15
E.2 Description de l'écosystème	15
E.3 Espèces végétales cultivées ou apparentées sauvages sexuellement compatibles	15

F. Information concernant la dissémination	15
F.1 Objectif de la dissémination	15
F.2 Date et durée de l'opération	16
F.3 Méthode de dissémination	16
F.4 Préparation du site avant, pendant et après la dissémination	16
F.5 Nombre approximatif de plantes	16
G. Mesures de prévention de dispersion	16
G.1 Précautions prises	16
G.2 Description des méthodes de traitement du site après dissémination	17
G.3 Description des méthodes de traitement après dissémination pour le matériel issu de plantes génétiquement modifiées, y compris pour le traitement des déchets	17
G.4 Description des plans et techniques de surveillance	17
G.5 Description des plans d'urgence	17
H. Incidence de la dissémination sur l'environnement	18
H.1 Modification de la persistance ou de la vitesse de propagation dans les habitats agricoles	18
H.2 Avantages ou inconvénients sélectifs conférés par transfert de gènes aux autres espèces sexuellement compatibles	18
H.3 Incidences des interactions avec les organismes non-cibles (absence d'organismes cibles)	18

INTRODUCTION

Au cours de la campagne 2001 en France, 450 000 agriculteurs ont cultivé 3 408 000 hectares de maïs, pour moitié en production de maïs grain et pour moitié en production de maïs fourrage (ensilage). 6 200 000 doses de 50 000 grains ont été utilisées comme semences pour assurer ces productions. La totalité de ces doses était constituée de variétés de maïs hybrides dont les semences sont issues de la fécondation dirigée de lignées femelles par des lignées mâles. En raison des avantages liés à la culture de maïs hybrides (rendement élevé et sécurisé, meilleure qualité des productions, etc), la mise en culture d'autres types génétiques de maïs (populations) n'est qu'anecdotique.

La France est le second pays producteur de semences de maïs derrière les Etats-Unis, exportant largement à travers l'Europe (45 % de sa production). Cette production est assurée par quelques milliers d'agriculteurs-multiplicateurs, sur une surface de près de 51 000 hectares, principalement dans le Sud-Ouest, l'Anjou, le Centre, Rhône-Alpes et l'Auvergne. Economiquement, cette activité fait vivre de nombreux agriculteurs, quelques sociétés semencières et coopératives et a dégagé, par les seules exportations, un excédent de balance commerciale de près de 170 millions d'euros pour la campagne 2001.

La production nécessite une opération mécanique ou manuelle de castration des plantes pour pouvoir diriger le sens de croisement et obtenir les semences de maïs hybride. Cette opération, rendue difficile en raison d'une main d'œuvre manquante et de plus en plus coûteuse, revient au producteur à environ un millier d'euros par hectare. Des technologies d'utilisation de lignées « mâle-stériles » reposant sur une stérilité d'origine cytoplasmique ont été introduites ; elles permettent de réduire fortement le coût de production des hybrides. La part de production de semences utilisant cette technologie a été d'environ 9% en 2001, révélant cependant des problèmes de fiabilité dus à la présence de plantes femelles dites « fluctuantes », c'est-à-dire mâle-fertiles, entraînant parfois le déclassement de la production par défaut de qualité. Ce phénomène est influencé par les conditions pédo-climatiques qui rendent difficile le développement de cette technologie.

Dans un contexte général de réduction des coûts, imposé notamment par les règles de la Politique Agricole Commune et des accords internationaux, la baisse des coûts de production des semences s'impose comme une nécessité, découlant de l'effritement du prix de vente des semences. Si la technologie des lignées mâle-stériles d'origine cytoplasmique est une voie possible, elle présente certains inconvénients qui nous amènent à évaluer un autre système, *via* la transgénèse, qui permettrait de fiabiliser et sécuriser les productions d'hybrides.

Notre stratégie a été choisie en considérant le rôle important joué par les cellules du tapis de l'anthere dans la production de grains de pollen fonctionnels. Le tapis entoure l'anthere (ou sac pollinique) au stade précoce de son développement, il dégénère pendant les stades ultérieurs et se présente sous forme désorganisée dans l'anthere mature. Il semble que les cellules du tapis fournissent des nutriments et des éléments structuraux lors du développement des microspores. D'autres rôles sont attribués à ces cellules, notamment la production d'une activité enzymatique (la callase) nécessaire à la libération des grains de pollen. Le rôle important de ces cellules est souligné par le fait que, chez des mutants mâle stériles de pétunia, la stérilité est souvent reliée à un dysfonctionnement de ce type de cellules.

Pour obtenir des plantes de maïs mâle-stériles, nous avons utilisé un gène entraînant la dégradation des ARN dans la cellule et l'avons mis sous le contrôle de régions régulatrices de son fonctionnement consistant en un promoteur végétal dont l'expression est spécifique au tapis de l'anthere et d'un terminateur de transcription. L'expression de ce gène a pour conséquence la dégénérescence et la mort des cellules du tapis de l'anthere. La destruction de ces cellules qui entourent les sacs polliniques empêche alors la formation de grains de pollen fonctionnels et conduit ainsi à une stérilité mâle génique à caractère dominant. L'obtention d'une stérilité mâle génique artificielle par expression d'une protéine dégradant les ARN dans l'anthere a déjà été réalisée par plusieurs auteurs.

Les techniques d'obtention des plantes transgéniques *in vitro* reposent généralement sur un processus en deux phases généralement liées : la première consiste à transformer des cellules végétales choisies pour leur compétence à la transformation génétique, la seconde consiste à régénérer, à partir de ces cellules transformées, une plante fertile qui pourra donner une descendance. Au cours de cette seconde phase, il est nécessaire d'appliquer une pression de sélection pour favoriser la régénération de plantes à partir des seules cellules transformées, la transformation des cellules étant un événement rare qui ne pourrait être facilement repéré sans sélection drastique.

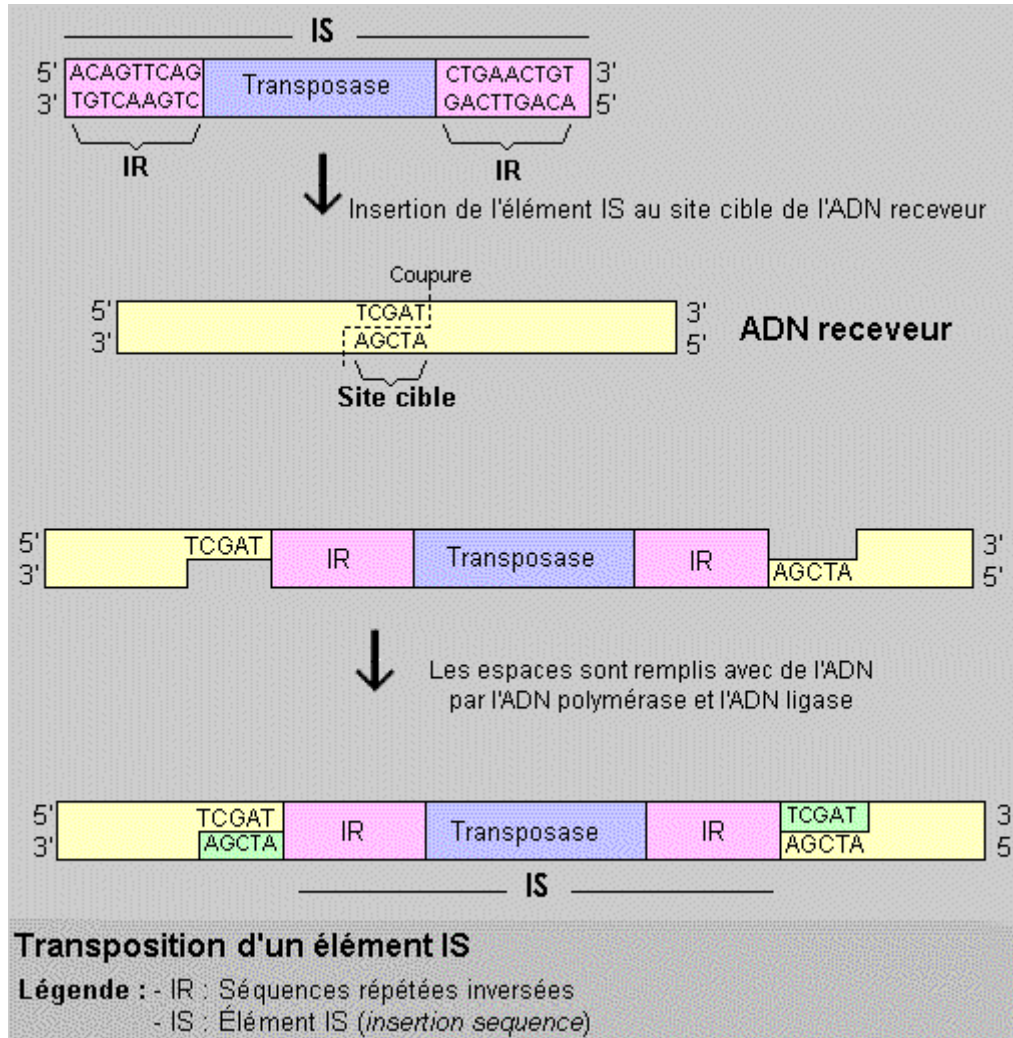
Cette sélection est réalisée par culture *in vitro* sur un milieu toxique pour les cellules non-transformées ; un tel milieu est obtenu par addition d'un antibiotique ou d'un herbicide. Dans le même temps, les cellules transformées à l'aide d'un gène de résistance au même antibiotique ou au même herbicide, en association avec le gène d'intérêt que l'on désire introduire dans le végétal, peuvent continuer à croître et à se développer.

Bien que de nombreux travaux et études aient montré une absence de risque dans l'utilisation de gènes de sélection que constituent certains gènes de résistance aux antibiotiques (une synthèse est disponible en anglais sur le site <http://www.kluyver.stm.tudelft.nl/efb/TGPPB/Home.htm>), la pression publique et les nouvelles orientations réglementaires européennes déconseillent fortement leur utilisation. Une prise de position conjointe de la Commission de Génie Génétique et de la Commission du Génie Biomoléculaire sur la dispersion potentielle des gènes de résistance aux antibiotiques est disponible à l'adresse suivante <http://www.recherche.gouv.fr/commiss/genetique/antibio/defaultb.htm>. Plusieurs stratégies destinées à limiter ou à éviter l'utilisation de gènes de sélection ont été imaginées ; parmi celles-ci, l'élimination des gènes de sélection, après la phase de culture *in vitro* où ils sont nécessaires, est une voie en cours d'exploration (voir la référence citée ci-dessus).

Nous envisageons l'utilisation d'un système d'élimination basé sur l'utilisation d'éléments naturellement présents dans tous les génotypes de maïs : les transposons, dont l'existence est connue depuis les travaux de Barbara McClintock (<http://clio1.cshl.org/public/mcclintock.html>). Ces éléments, trouvés dans la plupart des organismes, présentent la caractéristique d'être mobiles, c'est à dire de pouvoir changer de position sur les chromosomes.

Ces transposons sont des éléments naturellement présents dans la plupart des espèces, animales ou végétales. Chez l'homme, les 4 classes connues d'éléments transposables représentent 45 % du génome et leur nombre est estimé à plus de 3 millions de copies. Chez le végétal, transposons et rétrotransposons représentent 60 à 70 % du génome.

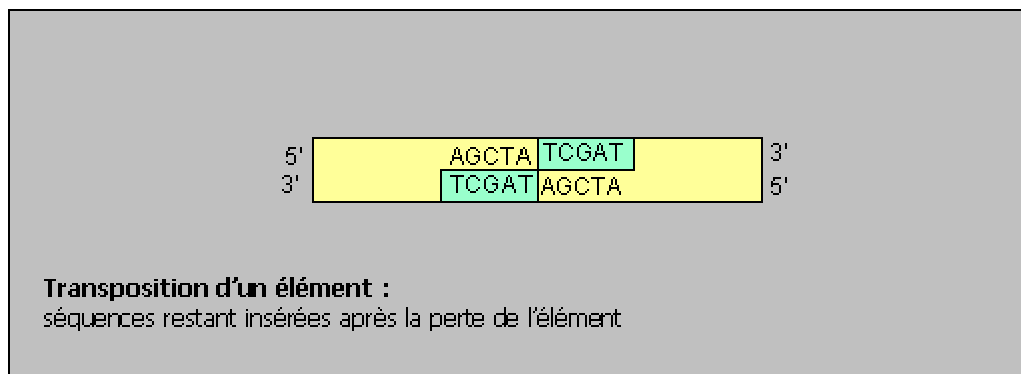
Une dizaine de transposons différents ont été trouvés à ce jour dans le maïs et il en existe probablement plusieurs autres. Parmi les plus étudiés on retrouve *MuDR*, *Mp*, *Uq*, *Ac/Ds* et *Spm*. La structure générale des transposons est figurée ci-dessous (figure tirée du site <http://www.irbv.umontreal.ca/francais/cours/transposon2/mol.htm>).



Les mouvements des éléments transposables sont assurés par la transposase, codée par l'élément lui-même qui reconnaît les séquences des extrémités terminales de l'élément (ITR, Inverted Terminal Repeat, notées IR sur la figure ci-dessus). Des éléments défectifs existent également et correspondent à des transposons dont la séquence de la transposase présente des délétions internes plus ou moins importantes. Les extrémités de ces éléments comportent toujours les ITR. Ils sont incapables de se mouvoir seuls. Deux facteurs sont donc indispensables à la transposition : une source de transposase active et les séquences ITR.

Les nombreuses études menées sur les éléments transposables montrent que plus de 70% des éléments transposables excisés se réinsèrent ailleurs dans le génome, dans des zones préférentielles hypométhylées et actives ; les autres ne se réinsèrent pas, se perdent et sont ensuite dégradés.

Nous avons utilisé, pour réaliser la transformation des maïs qui font l'objet de ce dossier, une construction dans laquelle le gène de sélection a été inséré entre deux ITR de maïs ; ce gène est lié au gène d'intérêt qui est placé à l'extérieur des ITR. Cette construction est transférée dans le végétal par transformation *via Agrobacterium tumefaciens*. L'encadrement du gène de sélection, le gène *npt II* conférant une résistance aux aminoglycosides comme la kanamycine, par des séquences ITR permettra son élimination. Tous les génotypes de maïs possèdent une activité transposase, mais avec une activité variable. Cependant, pour augmenter la fréquence d'excision, nous avons choisi de croiser les événements de transformation obtenus par une lignée de maïs où l'activité de la transposase est naturellement élevée. L'excision se fait alors par un processus en « trans » et le gène d'intérêt reste alors seul présent dans le végétal. L'éléments constitué par le gène de sélection encadré par les séquences ITR, une fois excisé, conduit alors à la structure suivante :



Nous souhaitons valider l'utilisation possible de ce système d'élimination de gène de sélection sur un nombre important de plantes pour apprécier la fréquence de transposition. Au delà du fait que l'excision ne se produise que dans 30% des cas environ, la localisation de l'excision est déterminante : elle peut être somatique ou germinale.

Une excision somatique ne touche pas les gamètes et conduit à la formation de graines et d'individus chimériques dont une partie des cellules possèdent encore le gène marqueur de sélection alors qu'à l'inverse, une excision germinale conduit à la formation de grains et d'individus constitués de cellules où l'ADN-T ne possède plus l'élément porteur du gène de sélection. S'il n'y a pas eu réinsertion de l'élément dans une autre région du génome, ces cellules sont dépourvues du gène de sélection. C'est la fréquence de cette dernière situation que nous souhaitons évaluer.

L'essai proposé concerne des événements de transformation dont le gène d'intérêt conduit au caractère de stérilité mâle qui peut être utilisé pour la production de semences hybrides. Ce gène d'intérêt a été introduit dans une construction comportant le gène de résistance à la kanamycine, antibiotique ayant servi à sélectionner les cellules et les plantules obtenues après transformation à l'aide d'*Agrobacterium*. Ce gène de résistance à la kanamycine, encadré par les séquences ITR d'un transposon du maïs, peut être éliminé dans la descendance des plantes contenant cet événement de transformation après croisement avec une lignée où la transposase est naturellement active.

La fonctionnalité de ce système a été observée en serre, mais la fréquence d'excision doit être évaluée sur des effectifs plus importants. Les résultats de cette évaluation aideront à prendre une décision sur l'utilisation future de cette stratégie d'élimination de gène de sélection.

A INFORMATIONS ADMINISTRATIVES GENERALES

A.1. Nom et adresse du notifiant

Le notifiant est :
Société BIOGEMMA S.A.S.
5, rue Saint Germain l'Auxerrois
75001 PARIS

A.2. Qualification et expérience du responsable scientifique

L'ensemble des responsables et leurs équipes de chercheurs et de techniciens ont déjà conduit différents essais au champ sur différentes espèces végétales depuis plusieurs années. Ces essais portaient aussi bien sur des caractères de type agronomique que sur des caractères relatifs à la qualité de la récolte.

A.3. Titre du projet

Essai au champ d'un maïs mâle-stérile et évaluation d'un système d'élimination de gène de sélection
--

A.4. Développements ultérieurs envisagés

L'expérimentation au champ est destinée à évaluer la fonctionnalité d'un système d'élimination de gène de sélection. Seules les lignées présentant le caractère de stérilité mâle (absence complète de pollen dans les anthères), et ne possédant plus le gène marqueur de sélection, sont susceptibles de faire l'objet d'un développement ultérieur et de nouvelles expérimentations en champ en vue d'une meilleure connaissance des lignées retenues.
Il n'est pas à ce jour prévu d'autre utilisation pour ce matériel biologique.

B CARACTERISTIQUE BIOLOGIQUE DE L'ESPECE VEGETALE RECEPTRICE

B.1. Position taxonomique

Zea mays ssp. mays

Nom de famille : Graminae
Genre : *Zea*
Espèce : *mays*
Sous-espèce : *mays*
Nom usuel : maïs

L'origine géographique supposée de cette plante est le Mexique et l'Amérique centrale.

B.2. Mode de reproduction et compatibilité sexuelle avec la flore

B.2. a) Information concernant la reproduction du maïs

B.2.a)i. Mode de reproduction

Le maïs est une plante monoïque à fleurs mâles et femelles portées sur la même plante mais séparées. Les fleurs mâles, regroupées au sommet de la tige en une inflorescence terminale appelée panicule, ne portent que des étamines entourées de glumelles. Elles apparaissent les premières (phénomène de protandrie). Les fleurs femelles, groupées en un ou plusieurs épis à l'aisselle des feuilles, n'apparaissent que par leurs longs styles appelés « soies » sortant des bractées ou spathes entourant chaque épi. Chaque fleur contient un ovaire unique, chaque épi comprend de 300 à 500 fleurs environ.

B.2.a)ii. Facteurs spécifiques affectant la reproduction

La reproduction de cette plante est assurée par la libération du pollen contenu dans les étamines (organes de la panicule) par ouverture des sacs polliniques ou anthères.

Le mode de reproduction du maïs est dit allogame (pollinisation par une autre plante de maïs) anémophile (pollinisation par le vent). La pollinisation du maïs en condition naturelle se réalise principalement par fécondation croisée (allofécondation supérieure à 95%). Un faible taux d'autofécondation est néanmoins possible (inférieur à 5%).

B.2.a)iii. Temps de génération

Le maïs est une plante à cycle biologique court : le temps de génération du semis à la récolte des grains est d'environ 7 à 8 mois. Le semis, en France, a lieu à partir du mois d'avril et la récolte en octobre - novembre.

B.2b) Compatibilités sexuelles avec d'autres espèces sauvages ou cultivées

Il n'y a pas d'hybridation interspécifique possible en France du fait de l'absence d'espèces voisines ou apparentées se développant spontanément sur le territoire français.

B.3. Capacité de survie

B.3.a) Capacité à former des structures de survie ou de dormance

Le maïs est une plante annuelle qui se reproduit par graine et ne présente pas de moyens de reproduction végétative en condition naturelle. Les semences sont nombreuses mais leur viabilité est fortement limitée. Les semences sont en effet très sensibles aux maladies et au froid. Il n'y a en général pas de repousse à la suite d'une culture de maïs, seuls les épis non battus peuvent permettre au grain de conserver éventuellement une capacité de germination l'année suivante.

B.3.b) Facteurs spécifiques affectant la capacité de survie

Les graines ne présentent pas de dormance. Les conditions climatiques hivernales de manière générale ne permettent pas la repousse de cette plante. Les pratiques agricoles courantes conduisent également à la destruction des graines.

B.4. Dissémination

La dissémination du maïs peut s'effectuer par l'intermédiaire du pollen et des graines :

- le pollen provenant de l'inflorescence mâle est dispersé par gravité et par le vent. Le début de la libération du pollen a lieu généralement deux ou trois jours avant l'apparition des soies des épis femelles. La durée de floraison des fleurs mâles est de 6 à 10 jours.
- la viabilité des semences est fortement limitée car elles sont sensibles aux maladies et surtout au froid hivernal. C'est pourquoi il n'y a en général pas de repousses de maïs.

B.5. Distribution géographique de la plante

Le maïs est dépendant de l'homme pour sa dispersion géographique. Le maïs est utilisé, soit comme ensilage, soit pour sa production de grains. Il s'agit de la première culture céréalière du monde en terme d'importance. La production française de maïs est localisée principalement dans les régions suivantes :

- Aquitaine et Midi-Pyrénées,
- façade atlantique et notamment en Poitou-Charentes,
- Est et notamment région Rhône-Alpes et Alsace,
- les zones au nord de la Loire (Centre, Ile-de-France, Picardie, Champagne-Ardenne).

B.6. Description de l'habitat naturel de la plante

Le maïs, originaire d'Amérique centrale, n'a pas d'habitat naturel en Europe. Il ne se développe pas en dessous de 9-10 °C et a une température optimale de croissance de 30 à 33°C. En climat continental (Canada, URSS), le maïs est cultivé jusqu'au 60^{ème} parallèle.

Le maïs est sensible à de nombreux parasites et ravageurs. Les plus importants sont les parasites fongiques (*Fusarium sp.*, *Ustilago maydis*, *Sphacelotheca reliana*, ...) et les insectes (taupin, pyrale et sésamie).

B.7. Interactions avec des organismes autres que les plantes

Durant sa culture, le maïs peut-être en interaction avec des ravageurs présents dans le sol (taupins, vers gris), dans ses propres tissus (pyrales, sésamies) ou à sa surface (pucerons). Il est également en interaction avec des organismes pathogènes, essentiellement des champignons (*Fusarium*, *Helminthosporium*, *Ustilago*, etc).

C TRANSFORMATION GENETIQUE DES PLANTES

C.1. Méthode de transformation

Les plantes de maïs faisant l'objet de ce dossier ont été obtenues grâce à la technique de transformation par *Agrobacterium tumefaciens*.

Le transfert de séquences d'ADN dans le maïs est basé sur les propriétés naturelles d'*Agrobacterium tumefaciens* et sur l'utilisation de vecteurs « désarmés ». Des embryons immatures de maïs sont mis en co-culture avec les cellules d'*Agrobacterium*, les embryons sont transférés et cultivés *in vitro* sur un milieu de sélection contenant un antibiotique : la kanamycine. Les cals de cellules qui se développent alors sont constitués de cellules transformées ; des plantes transgéniques sont ensuite régénérées à partir de ces cals.

C.2 Nature et source des vecteurs utilisés

Le vecteur utilisé pour la transformation du maïs par *Agrobacterium tumefaciens* est un plasmide superbinaire.

C.3 Taille, origine et fonction voulue de chaque fragment constituant de la région envisagée pour le transfert

La région envisagée pour le transfert est constituée d'un gène bloquant la formation du grain de pollen, associé à un gène marqueur qui confère la résistance à l'antibiotique kanamycine dans les cellules transformées et permet de sélectionner les plantes transformées lors des étapes de culture *in vitro*.

D LE MATERIEL VEGETAL TRANSGENIQUE

D.1 Traits et caractéristiques introduits

Les plantes qui seront cultivées au champ portent une stérilité mâle génique artificielle liée à la résistance à la kanamycine. Certaines de ces plantes sont mâle-stériles et seulement partiellement résistantes à cet antibiotique ; d'autres, en nombre réduit, sont mâle-stériles et sensibles à la kanamycine (comme les plantes de maïs habituellement cultivées). Certaines peuvent être uniquement résistantes à la kanamycine.

D.2. Information sur les séquences réellement transférées

Les résultats des analyses moléculaires (analyses de type Southern portant sur l'ADN des plantes transformées) des plantes de maïs faisant l'objet de cette demande ont été présentés aux experts chargés de l'évaluation de ce dossier.

Ces résultats ont permis de montrer que le gène conférant la stérilité mâle a été intégrée dans le génome de la plante d'une façon stable.

D.3 Informations concernant l'expression de l'insert

L'expression des gènes de l'insert peut être mise en évidence par analyse moléculaire ou biochimique ainsi que, pour certaines plantes, par l'observation du phénotype de résistance à la kanamycine.

D.4 Description des différences entre la plante supérieure génétiquement modifiée et la plante réceptrice

D.4.a) Mode / vitesse de reproduction

Le mode de reproduction des plantes mâle-stériles n'est pas changé dans la mesure où le maïs est principalement allogame et que la fécondation est assurée par le transport de pollen d'une plante à une autre par le vent. La modification essentielle des plantes mâle-stériles rend ces plantes allogames strictes, c'est à dire incapables de s'autoféconder et de féconder d'autres plantes de maïs.

D.4.b) Dissémination

La capacité de dissémination des plantes transformées *via* le pollen est annulée puisque les plantes mâle-stériles ne produisent plus de pollen : elles sont donc incapables de s'autoféconder ou de féconder d'autres plantes de maïs.

Hormis l'absence de pollen, nous n'avons pas observé d'autres modifications par rapport à la lignée d'origine (précocité, morphologie de l'épi,...).

D.4.c) Capacité de survie

Cette capacité ne semble pas devoir être affectée : aucun avantage sélectif ne semble pouvoir être associé aux transgènes introduits : stérilité mâle et résistance à la kanamycine. Cet antibiotique n'a pas d'usage en agriculture.

D.5 Stabilité génétique des inserts

De nombreuses analyses moléculaires et génétiques de plantes transgéniques obtenues par la technique de transformation par *Agrobacterium tumefaciens* ont montré que l'intégration des transgènes se fait dans le génome nucléaire de la plante. Dans les plantes qui font l'objet de ce dossier, les transgènes présentent une expression et une héritabilité stables de type mendélien. Cette stabilité d'insertion et d'expression a été observée sur plusieurs générations de plantes cultivées en serre.

D.6 Possibilité de transfert de matériel génétique des plantes génétiquement modifiées dans d'autres organismes

Les études menées jusqu'à présent n'ont pas permis de mettre en évidence un transfert de gène dans la nature entre bactéries et eucaryotes. En ce qui concerne le transfert horizontal, aucune donnée ne laisse supposer que les transgènes puissent avoir un comportement différent d'un gène endogène pour les plantes cultivées au champ. Des informations supplémentaires sont disponibles sur le site <http://europa.eu.int/comm/research/quality-of-life/gmo/index.html>.

Les transferts interspécifiques et intergénériques ne sont pas possibles dans le cas du maïs cultivé en France car aucun genre et aucune espèce végétale ne peuvent être fécondés par le pollen de maïs.

D.7 Toxicité ou effet nocif pour la santé publique et l'environnement de la modification apportée

La modification génétique confère aux plantes transgéniques la résistance aux aminoglycosides (composés antibiotiques comme la kanamycine ou la généticine) ainsi qu'un phénotype de stérilité mâle génique artificielle. Les deux gènes introduits responsables de ces caractères ne présentent pas de risque de toxicité particulier.

Il n'a pas été rapporté à ce jour, dans les études menées dans le cadre d'homologation de plantes génétiquement modifiées, de toxicité particulière associée au gène *nptII*. Un avis récent émis par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments développe de façon approfondie les raisons de cette absence de toxicité. Il est disponible sur le site suivant :

http://www.afssa.fr/actualites/index.asp?mode=actu&ladate=&id_info=4673&id_theme=1086

. Une prise de position conjointe de la Commission de Génie Génétique et de la Commission du Génie Biomoléculaire sur la dispersion potentielle des gènes de résistance aux antibiotiques est disponible à l'adresse suivante <http://www.recherche.gouv.fr/commis/genetique/antibio/defaultb.htm>.

Chez les plantes mâle-stériles, la production de la protéine dégradant les ARN conduit très rapidement à la mort des cellules qui la produisent, si bien que la production de protéine est trop faible pour être détectable. Aucune donnée ne fait état de son éventuelle toxicité. Aucun risque n'est attendu par rapport à l'ingestion éventuelle de tout ou partie de la panicule des plantes transgéniques.

A ce jour, nous ne disposons d'aucune indication pouvant laisser supposer une toxicité éventuelle des séquences introduites.

D.8 Interaction significatives avec des organismes non cibles

Aucune interaction particulière n'est attendue avec les organismes non cibles. La protéine néomycine phosphotransférase II (produit du gène *nptII*) n'est pas connue pour présenter de toxicité.

La protéine barnase est exprimée uniquement dans le tapis de l'anthere : l'effet de l'ingestion de parties végétatives de la plante ou de graines par des animaux éventuellement présents sur les sites d'essais peut être considéré sans conséquence vis à vis des organismes non cibles.

D.9 Description des méthodes de détection et d'identification de l'OGM

Les plantes transgéniques retenues pour cet essai sont identifiables par leur phénotype de stérilité mâle et pour certaines d'entre elles de résistance à la kanamycine.

Des techniques moléculaires peuvent également être utilisées telles que la technique Southern ou l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) sur les séquences introduites.

D.10 Historique des précédentes disséminations

Il s'agit de la première demande d'expérimentation en champ pour les événements de transformation présentés.

E CARACTERISATION DU SITE DE DISSEMINATION

E.1. Localisation et étendue du site de dissémination

Les sites de dissémination pour l'année 2002 se situent en région Auvergne. Le nom des communes où auront lieu ces essais seront fournis dans les Fiches d'Information du Public.

L'essai devrait couvrir une surface d'environ 1 800 m² dont 1 200 m² seraient occupés par les plantes transgéniques.

E.2. Description de l'écosystème

Les agrosystèmes concernés par l'expérimentation sont dédiés à la polyculture (céréales à paille, tournesol, maïs, pois, etc).

Les parcelles utilisées pour la mise en place de ces essais ne sont pas nécessairement isolées d'autres cultures de maïs. Les plantes transgéniques étant mâle-stériles, aucune dissémination de pollen transgénique n'est à prévoir vers d'autres espaces de culture.

Par ailleurs, des bordures agronomiques de maïs non transgéniques seront implantées autour des parcelles.

Aucune zone protégée n'est située à proximité des lieux d'expérimentations.

E.3. Espèces végétales cultivées ou apparentées sauvages sexuellement compatibles

Aucune espèce sexuellement compatible avec le maïs n'est présente à proximité des différents sites de dissémination. Aucun risque de dissémination de la modification génétique n'est donc attendu par hybridation interspécifique.

Des champs de maïs (production commerciale) peuvent être présents à proximité des sites d'expérimentation. Cependant, le caractère mâle stérile des plantes porteuses de la modification génétique rendant improbable tout risque de dissémination par le pollen, aucun isolement n'est proposé pour ce type d'expérimentation.

F INFORMATION CONCERNANT LA DISSEMINATION

F.1. Objectif de la dissémination

L'objectif de la dissémination est d'évaluer différents événements de transformation de maïs présentant le caractère de stérilité mâle. Il consiste également à évaluer la fréquence d'apparition d'excisions germinales qui conduiront à l'élimination du gène de résistance à la kanamycine inséré dans l'ADN-T.

Les semences produites au cours de ces essais seront utilisées uniquement à des fins de recherche : semis en serre, prochaines campagnes de culture en champ et analyses de composition. En aucun cas ces semences seront commercialisées ou utilisées à d'autres fins.

F.2. Date et durée de l'opération

Pour la campagne 2002, les essais sont prévus d'avril à novembre 2002.

Les autres campagnes se dérouleront d'avril à novembre 2003 et 2004.

Les semis seront effectués entre mi-avril et fin mai, les récoltes de fin à mi-novembre environ. Ces dates sont indicatives et peuvent être modifiées en fonction des conditions climatiques locales.

F.3 Méthode de dissémination

Les semis seront effectués manuellement ou à l'aide d'un semoir mécanique.

F.4 Préparation du site avant, pendant et après la dissémination

La préparation du sol sera effectuée selon les pratiques agricoles courantes. Après un labour et une préparation du lit de semis, les traitements du sol seront réduits aux traitements herbicides (par un herbicide homologué sur cette culture), insecticides et anti-limaces sur les sites d'expérimentation.

Les traitements en cours de la culture seront adaptés au type d'expérimentation, un désherbage chimique ou manuel sera appliqué selon les besoins.

La récolte des épis sera soit manuelle soit mécanique. Ces épis seront mis rapatriés en laboratoire où les graines seront conservées jusqu'à leur semis ou analyse.

Les résidus végétaux (épis non récoltés, tiges et feuilles) seront broyés sur place mécaniquement. Les résidus broyés seront ensuite enfouis par un travail superficiel du sol. Un labour d'hiver sera ensuite effectué. Aucune culture commerciale de maïs ne sera implantée sur les parcelles d'essai l'année suivante ; les éventuelles repousses de maïs seront détruites avant floraison.

F.5 Nombre approximatif de plantes

Le nombre approximatif de plantes transgéniques sur chaque site sera d'environ 9000.

G MESURES DE PREVENTION DE DISPERSION

G.1 Précautions prises

G.1.a) Distance d'isolement des autres espèces sexuellement compatibles

Etant donné le caractère de stérilité mâle exprimé dans les plantes transgéniques aucun isolement n'est proposé pour l'ensemble de ces essais.

G.1.b) Mesures minimisant la dissémination du pollen et des graines

Le risque de dissémination de pollen transgénique est extrêmement réduit puisque les plantes présentes dans cet essai sont porteuses d'une stérilité mâle génique artificielle.

Après semis, le surplus éventuel de graines est récupéré et rapatrié au laboratoire pour destruction. Ces précautions réduisent les risques de dissémination des graines en dehors de la parcelle d'expérimentation.

G.2 Description des méthodes de traitement du site après dissémination

Les épis des plantes transgéniques seront récoltés manuellement ou mécaniquement. Après la récolte, les résidus de plantes (tige, feuilles et racines) seront détruits par broyage et les restes seront enfouis sur la parcelle.

Les parcelles feront l'objet d'une surveillance régulière l'année suivant l'essai afin d'éliminer toute repousse éventuelle de maïs avant sa floraison.

G.3 Description des méthodes de traitement après dissémination pour le matériel issu de plantes génétiquement modifiées y compris pour le traitement des déchets

Le produit des récoltes (graines) sera transféré dans un laboratoire. Les semences seront stockées puis utilisées pour les semis ultérieurs en champ (campagnes 2003 et 2004) ou en serre ainsi que pour différentes analyses.

G.4 Description des plans et techniques de surveillance

Pendant la culture, l'essai sera suivi très régulièrement par le personnel responsable de la dissémination. La conformité de l'expérimentation aux conditions décrites dans ce dossier et dans l'autorisation du Ministère de l'Agriculture sera contrôlée par des agents assermentés des services de la Protection des Végétaux.

Après la destruction de l'essai, plusieurs visites seront effectuées et plus particulièrement au printemps pendant la période de germination des graines. Les éventuelles repousses de maïs seront éliminées avant leur floraison.

G.5 Description des plans d'urgence

Ces essais pourront être arrêtés en cas d'urgence (accident climatique majeur, vandalisme...). Les méthodes de destruction volontaire seront adaptées au stade de développement des plantes (traitement herbicide, broyage éventuellement après récolte des débris dispersés...). Elles seront appliquées dès que possible après la fin des constatations d'usage en pareil cas (huissiers, experts, gendarmes ...). Durant la période entre le déclenchement de la procédure d'urgence et sa réalisation, l'essai fera l'objet d'une surveillance étroite.

H INCIDENCE DE LA DISSEMINATION SUR L'ENVIRONNEMENT

H.1 Modification de la persistance ou de la vitesse de propagation dans les habitats agricoles

La modification introduite dans les plantes de maïs (résistance à la kanamycine et stérilité mâle) n'est pas de nature à affecter la persistance des plantes dans l'environnement. Au contraire, le caractère mâle-stérile conféré aux plantes porteuses de la modification génétique affecte la capacité des plantes à se reproduire (absence de pollen) et donc à persister dans l'environnement. Excepté l'absence de production de pollen, aucune modification du cycle végétatif et reproductif n'a été observée en serre.

La kanamycine, produit utilisé pour la sélection des plantes transformées lors des étapes de culture *in vitro*, n'est pas présent dans l'environnement et n'a pas d'usage agricole. Il ne peut constituer une pression de sélection favorisant ces plantes transgéniques.

H.2 Avantages ou inconvénients sélectifs conférés par transfert de gènes aux autres espèces sexuellement compatibles

La seule espèce sexuellement compatible en Europe est le maïs. Le transfert de matériel génétique *via* le pollen vers d'autres cultures de la même espèce sera hautement improbable étant donné le caractère mâle-stérile des plantes et l'absence d'espèces apparentées. De plus, la culture du maïs dans les agrosystèmes à partir de semences hybrides produites selon un cahier de charges rigoureux, la non-utilisation de « semences de ferme » rendent les possibilités d'obtenir des plantes descendantes d'inter-croisement suite à un flux pollinique très hautement improbable. De plus, aucun avantage ou inconvénient sélectif n'est attendu si un tel transfert se produisait.

H.3 Incidences des interactions avec les organismes non cibles (absence d'organisme cible)

Les plantes faisant l'objet de ce dossier n'ont pas vocation à agir directement sur des organismes cibles. Aucune interaction particulière n'est prévisible au cours de ces essais. L'incidence écologique de ces essais peut être considérée comme minime.