

**Demande d'autorisation pluriannuelle  
pour dissémination volontaire de  
plantes génétiquement modifiées :**

**DOSSIER TECHNIQUE**

**TESTAGE D'HYBRIDES DE MAÏS  
GENETIQUEMENT MODIFIES  
RESISTANTS AUX INSECTES COLEOPTERES  
ET TOLERANTS A UN HERBICIDE**

**PIONEER GENETIQUE SARL**

## **PREAMBULE**

**Le présent dossier de demande d'autorisation pluriannuelle pour la dissémination aux champs de plantes de maïs génétiquement modifié est soumis dans le cadre de la Directive 90/220 (et de la future Directive 2001/18).**

**Les informations contenues dans ce dossier sont liées à l'état d'avancement de la recherche pour identifier l'événement de transformation qui sera éventuellement mis sur le marché.**

**La dissémination envisagée concerne des essais de recherche à des fins réglementaires qui doivent être effectués en Europe selon les principes directeurs de la Directive 90/220. L'objectif de ces essais est de collecter des données sur la composition analytique et l'expression des protéines produites par les plantes génétiquement modifiées en comparaison avec les plantes équivalentes non modifiées.**

## SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	5
<b><u>A. INFORMATIONS GENERALES</u></b> .....	13
<b><u>B. INFORMATIONS CONCERNANT L'ORGANISME RÉCEPTEUR</u></b> .....	14
<b><u>C. INFORMATIONS CONCERNANT LA MODIFICATION GENETIQUE</u></b> .....	18
<b><u>D. INFORMATION CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE</u></b> .....	19
<b><u>E. CARACTERISATION DU SITE DE DISSEMINATION</u></b> .....	25
<b><u>F. INFORMATION CONCERNANT LA DISSEMINATION</u></b> .....	26
<b><u>G. INFORMATION SUR LES PLANS DE SURVEILLANCE, DE CONTRÔLE ET DE TRAITEMENT DU SITE ET DES DECHETS APRES DISSEMINATION</u></b> .....	27
<b><u>H. INFORMATION SUR LES ÉVENTUELLES INCIDENCES DE LA DISSEMINATION DES PLANTES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉES SUR L'ENVIRONNEMENT</u></b> .....	29

## INTRODUCTION

Cette demande d'essais aux champs porte sur du maïs génétiquement modifié, par l'ajout de gènes issus d'une bactérie du sol, *Bacillus thuringiensis*, pour résister à des insectes coléoptères ravageurs, les chrysomèles des racines.

Les chrysomèles des racines du maïs causent chaque année des dégâts énormes sur les récoltes en Amérique du Nord. Même si à l'heure actuelle très peu de dégâts économiques liés à la chrysomèle des racines du maïs ont été notés en Europe, cet insecte ne cesse de s'y développer dans les zones où le maïs est cultivé. Il faut donc d'ores et déjà mettre en place un système de lutte de façon à arrêter cette expansion.

### 1- Description et biologie de l'insecte

La chrysomèle des racines du maïs, insecte Coléoptère, est le principal ravageur du maïs en Amérique du Nord (Etats-Unis, Canada) et cause chaque année des pertes estimées à plusieurs millions de dollars. Les deux principales espèces de chrysomèles des racines engendrant des dommages économiques sont *Diabrotica virgifera virgifera* (chrysomèle des racines, de l'ouest, figure 1), la plus agressive, et *Diabrotica barberi* (chrysomèle des racines du nord, figure 2). La chrysomèle des racines du maïs de l'ouest est jaune avec des bandes noires longitudinales sur les ailes, alors que celle du nord est de couleur vert pâle.



Figure 1 : adulte de *Diabrotica virgifera virgifera*  
(source *European and Mediterranean Plant Protection Organization*)



Figure 2 : adultes de *Diabrotica barberi*

Les adultes pondent de petits oeufs blancs et ovales de moins de 0,1 mm de longueur. Les oeufs hivernent dans le sol et commencent à se développer au printemps quand la température du sol atteint 10 ou 11 °C. Après leur émergence, les larves commencent à envahir les racines du maïs à partir de la mi-juin. Les jeunes larves sont des vers minces et cylindriques au corps blanc muni de six petites pattes situées juste derrière la tête de couleur brune (figure 3). Les chrysomèles des racines du maïs passent par trois stades larvaires (mue) avant de devenir adultes. Lorsque leur développement est complet, les larves mesurent environ 1,5 cm.



Figure 3 : Larves de chrysomèles des racines du maïs au développement complet mesurant 1,5 cm de long; le corps est blanc, la tête et l'extrémité sont brunes.  
(source Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires Rurales, Ontario)

Les larves de la chrysomèle des racines migrent dans le sol vers les racines des jeunes plants de maïs. Elles se nourrissent de ces racines (figure 4) pendant une période de 3 à 4 semaines jusqu'à ce que leur développement soit complet à la mi-juillet environ.



Figure 4 : Larve de chrysomèle se nourrissant sur une racine de maïs (IPM/Entomology, Department of Crop Sciences, University of Illinois).

Puis, elles s'éloignent des racines et se construisent une petite cellule de terre dans le sol dans laquelle elles se transforment en pupes molles de couleur blanche. Les pupes prennent 1 ou 2 jours pour se transformer en adultes.

Les adultes émergent des cases pupales et sortent du sol vers le début d'août. Les adultes sont des coléoptères à carapace dure d'environ 6 mm de long (figures 1 et 2 ci-dessus).

Les adultes se nourrissent des soies (styles des fleurs femelles) et des panicules (organes floraux mâles) du maïs. Les adultes de l'espèce de l'ouest se nourrissent aussi des feuilles des plantes. Environ deux semaines après l'accouplement, les femelles commencent à pondre leurs oeufs dans le sol, habituellement dans des crevasses près du pied des plantes à des profondeurs pouvant aller jusqu'à 20 cm.

L'humidité du sol influe sur le nombre et l'emplacement des oeufs pondus. Les chrysomèles pondent plus d'oeufs dans un sol humide que dans un sol sec. Dans un sol à forte teneur en humidité, les femelles peuvent pondre leurs oeufs plus près de la surface. La plupart des oeufs pondus sont dans un état de dormance, ou diapause, et doivent subir le gel de l'hiver avant de commencer leur développement au printemps suivant. Il n'y a qu'une génération de chrysomèles des racines du maïs par année.

Les adultes sortent d'un champ à mesure que le maïs parvient à maturité, car ils sont attirés par les plants plus jeunes des variétés de maïs plus tardives. Les adultes vivent assez longtemps; plusieurs peuvent survivre jusqu'aux premières grandes gelées.

## 2- Dommages dans les cultures de maïs

C'est l'alimentation des larves au niveau des parties souterraines des plants de maïs qui cause de loin les dommages les plus importants. Il est assez rare de constater des pertes économiques dues à l'alimentation de l'adulte sur les parties aériennes des plants de maïs.

### a) Dommages causés par les larves de chrysomèles

Le gaz carbonique que libèrent les racines du maïs attire les larves. Les petits vers commencent par se nourrir des poils absorbants des racines, puis, à mesure qu'ils grossissent, creusent des tunnels et des trous dans les plus grosses racines. Lors de graves infestations, la racine principale et les racines d'ancrage peuvent être complètement détruites (figure 5).



Figure 5 : Racines gravement endommagées comparé à des racines saines  
 (a- source EPPO, Prof. Edwards, Purdue University, USA)  
 (b- source Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires Rurales, Ontario)

Les plants dont le système racinaire est endommagé sont peu vigoureux car ils ne peuvent absorber suffisamment d'eau et d'éléments nutritifs. De plus, des plants affaiblis peuvent pencher (ou verser), surtout pendant une pluie ou une tempête. Dans un effort pour se redresser, les plants se recourbent et prennent la forme caractéristique du "col de cygne" (figure 6). Si la verse a été importante, les pertes à la récolte peuvent aussi contribuer à la diminution des rendements.



Figure 6 : Verse et plants en col de cygne dus à l'alimentation des larves sur les racines (b- source Ministère Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires Rurales, Ontario)

#### b) Dommages causés par les adultes de chrysomèles

Les adultes des deux espèces de chrysomèles se nourrissent des soies du maïs, du mois d'août aux premières gelées. Généralement, la plupart des variétés de maïs sont pollinisées avant l'émergence en masse des adultes et par conséquent, les dommages aux épis sont rares. Cependant, s'il s'agit d'un semis tardif ou d'un hybride qui produit des soies tardivement et

qu'un grand nombre d'insectes est présent, des pertes de rendement peuvent s'ensuivre à cause d'une pollinisation réduite (figure 7). Quand la pollinisation est terminée, l'alimentation des adultes n'occasionne plus de diminution de rendements.



Figure 7 : Epi sans grains dû à une mauvaise pollinisation. (source Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires Rurales, Ontario)

### 3- Méthodes de prévention dans les zones infestées (ex : Amérique du Nord)

Les méthodes de prévention contre les chrysomèles des racines du maïs concernent surtout l'étape larvaire de ce Coléoptère. Les deux principales stratégies de prévention contre les larves sont la rotation des cultures et l'application d'insecticide.

#### a) La méthode culturale : rotation des cultures

Les chrysomèles des racines du maïs déposent leurs œufs dans le sol. Après l'éclosion des œufs, les larves ne peuvent survivre que sur les racines du maïs. Par conséquent, la rotation du maïs avec une autre culture réduira les risques de ravages de la chrysomèle.

En effet, si on cultive chaque année du maïs au même endroit, le risque de destruction par les chrysomèles est très grand. D'où l'idée d'une méthode culturale qui permet d'alterner une culture de maïs (1<sup>ère</sup> année) et une espèce différente l'année suivante (2<sup>ème</sup> année) pour limiter les attaques sur le maïs cultivé la 3<sup>ème</sup> année. Cependant, cette pratique a montré ses limites aux Etats-Unis puisque la chrysomèle a développé un système de diapause prolongée, c'est à dire que les œufs n'éclosent que la 3<sup>ème</sup> année quand le maïs est resemé. Les larves se nourrissent alors des racines du maïs en

provoquant des dégâts identiques à ceux qui se seraient produits avec un semis de maïs en continu.

#### b) La lutte chimique : application d'insecticide

L'utilisation d'insecticides sous forme de poudre ou de liquide, ajoutés au sol lors des semis ou juste après, permet actuellement de limiter les dégâts causés par les larves de chrysomèles des racines du maïs. Un certain nombre de facteurs influent sur la performance d'un insecticide : ses propriétés physiques et chimiques, son mode d'application, la date du semis, le sol, les conditions climatiques. Rappelons que l'agriculteur utilisant des produits phytosanitaires doit, pour se protéger, respecter des règles d'hygiène et de sécurité pour la préparation et l'application de ces insecticides, leur stockage ou l'élimination des résidus.

Parfois, des insecticides sont vaporisés sur les feuilles et les fleurs pour lutter contre les insectes adultes.

Cependant, tout comme la rotation des cultures, la méthode de lutte chimique ne fait que limiter la population des chrysomèles des racines du maïs sans pour autant l'éliminer. En effet, une proportion considérable de coléoptères survit du fait que le champ n'est pas traité entièrement, seules les régions qui avoisinent les racines principales de la plante le sont.

Ces traitements ont de plus un coût élevé. Chaque année aux Etats-Unis en vue de lutter contre la chrysomèle des racines du maïs, une surface de 6 millions d'hectares est traitée avec des insecticides ce qui représente un coût de 195 millions de dollars.

#### 4- Situation de la chrysomèle des racines du maïs en Europe

En Europe, la chrysomèle des racines du maïs a été découverte pour la première fois en juillet 1992 en Serbie, dans un champ aux environs de Belgrade. Depuis, elle se répand surtout en direction du nord-ouest, assez rapidement. Des études préliminaires, réalisées par des chercheurs de l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture des Nations Unies (FAO), sur le potentiel d'infestation de *Diabrotica virgifera* sur l'ensemble de l'Europe ont montré qu'il était probable qu'elle survive et se développe partout où le maïs est cultivé en Europe. Les premières détections de *Diabrotica virgifera* rapportées au secrétariat de l'organisation européenne de protection des plantes l'ont été pour la Hongrie et la Croatie en 1995, pour la Roumanie en 1996, pour la Bosnie et

Herzégovine en 1997 (mais introduction probablement plus tôt), pour la Bulgarie, le Monténégro, l'Italie en 1998, pour la Slovaquie et la Suisse en 2000.

Ainsi, on ne trouve plus l'insecte seulement dans le bassin du Danube : des spécimens de *Diabrotica virgifera* ont été recueillis en Italie près de Venise en 1998 et près de Milan en 2000, ainsi qu'en Suisse, près de Lugano en 2000. La carte dans la figure 8 montre l'étendue de la présence de *Diabrotica virgifera* en Europe de 1992 à 2000.

La progression à partir d'un foyer atteint 20 à 60 km par an.

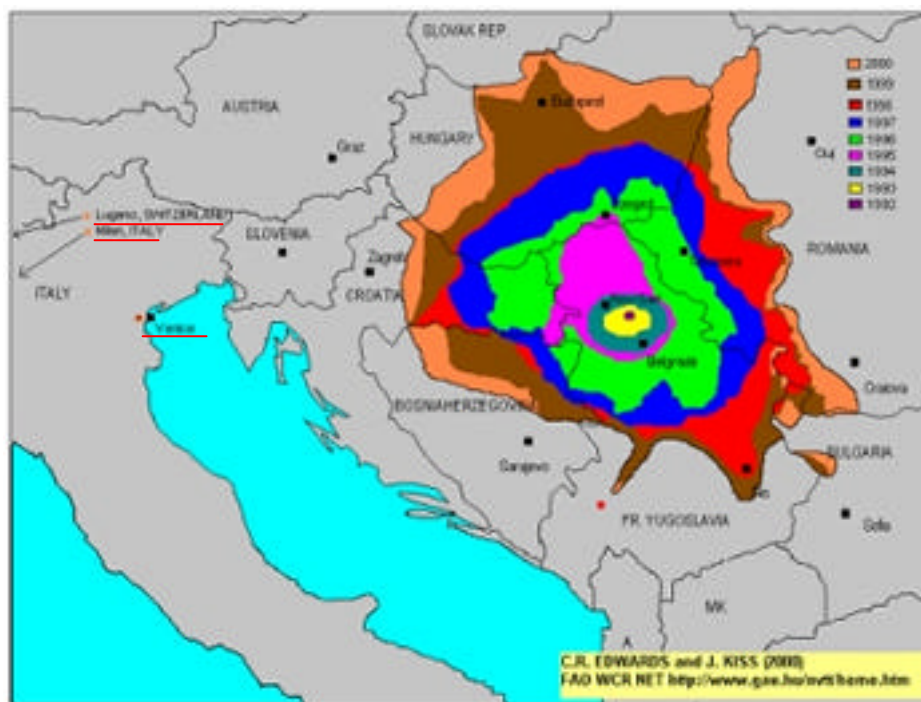


Figure 8 : Etendue de la présence de *Diabrotica virgifera virgifera* en Europe de 1992 à 2000 (C.R. EDWARDS et J. KISS, source EPPO).

## 5- Les méthodes de prévention en Europe

Actuellement, on essaie seulement de limiter l'extension des foyers par des programmes d'éradication.

### a) Exemple du programme de prévention mis en œuvre en Italie

En 2000, des mesures de confinement et d'éradication des chrysomèles des racines du maïs ont été mises en application en Italie. Ces mesures sont les suivantes :

- surveillance des populations de *Diabrotica virgifera* dans la zone de quarantaine (1200ha) définie et dans une zone tampon dans un rayon de 22 à 25km, en utilisant des pièges à phéromones sexuelles dans les champs

de maïs. Les insectes mâles sont attirés par des phéromones synthétiques reproduisant les phéromones sexuelles émises normalement par les femelles et pris au piège.

- interdiction de la monoculture du maïs
- applications de deux traitements insecticides contre les adultes (de juillet à la fin août) dans tous les champs de maïs de la zone contrôlée (zone de quarantaine et zone tampon)
- interdiction de toute circulation de plantes de maïs ou de terre dans laquelle des plantes de maïs ont été cultivées l'année précédente dans la zone de quarantaine
- interdiction de récolter avant le 1<sup>er</sup> octobre

Le coût total de ce programme de confinement et d'éradication en 2000 a été estimé à approximativement 81 500 euros (source European Plant Protection Organization).

Mais l'existence de très petites zones de monoculture du maïs est suffisante pour maintenir des populations élevées de *Diabrotica virgifera* et donc assurer leur reproduction et la croissance des zones infestées. De plus, d'autres pays n'appliquent pas de telles mesures de prévention et le *Diabrotica* continue à progresser.

En France, le service de la Protection des Végétaux, dépendant du Ministère de l'Agriculture, est en alerte sur ce problème et a mis en place des piégeages à la frontière italienne pour surveiller l'introduction de *Diabrotica* en France.

Ces moyens de lutte sont insuffisants car ils ne garantissent pas contre l'apparition de nouveaux foyers. Le moyen de lutte le plus approprié est donc la possibilité d'utiliser un nouveau type de maïs capable de s'auto-protéger contre ces insectes ravageurs.

De nouvelles variétés de maïs, issues des biotechnologies, qui sont résistantes à ces insectes Coléoptères vont contribuer au maintien des rendements qui seraient diminués par les dégâts causés par la chrysomèle des racines du maïs. Grâce à l'utilisation de ces plantes génétiquement protégées, des quantités importantes d'insecticides pourront être économisées, ce qui présente outre un avantage financier pour l'agriculteur, un avantage au niveau écologique. Cela est aussi un avantage pour les organismes du sol qui vivent à proximité des racines du maïs car ce moyen de protection agit de façon spécifique sur les espèces cibles qui se nourrissent du maïs, contrairement aux insecticides chimiques qui ont un large spectre d'action.

Les plantes génétiquement modifiées faisant l'objet de cette demande sont des plantes de maïs dans lesquelles ont été introduits deux gènes permettant la synthèse de deux protéines qui, en combinaison, permettent à la plante de résister à certains insectes coléoptères. De plus, un gène marqueur a été introduit pour les besoins de la sélection cellulaire. Ce gène confère au maïs une tolérance à l'herbicide glufosinate-ammonium. La protéine produite acétyle la phosphinothricine, ingrédient actif de l'herbicide glufosinate d'ammonium. La phosphinothricine est ainsi convertie en une forme inactive qui n'est plus toxique pour les plantes de maïs, ce qui leur confère une tolérance à l'herbicide. S'il le souhaite, l'agriculteur pourra aussi effectuer un désherbage du champ de maïs avec du glufosinate.

Ces plantes génétiquement modifiées sont donc un outil supplémentaire que l'on envisage de mettre à disposition de l'agriculteur pour lutter efficacement contre les dégâts provoqués par certains insectes Coléoptères. Dans ce but, il convient de rassembler des données susceptibles d'être utilisées pour une demande ultérieure de mise en marché en Europe d'hybrides génétiquement protégés.

La dissémination envisagée de plantes de maïs génétiquement modifiées a pour but de réaliser, en milieu ouvert, dans les conditions françaises, des analyses comparées de la composition d'hybrides de maïs génétiquement modifiés et de leurs équivalents non modifiés. Ce type d'étude du comportement ne peut être réalisé qu'au champ dans lequel l'interaction entre le génotype et le milieu s'exprime pleinement. Pour cette évaluation, des prélèvements de différents échantillons de tissus végétaux sur les plantes seront réalisés à plusieurs stades de croissance.

## **A. INFORMATIONS GENERALES**

1- Nom et adresse du notifiant (société ou institut)

SOCIETE PIONEER GENETIQUE SARL  
Affaires Techniques et Réglementaires  
Chemin de l' Enseigure  
31840 Aussonne

2- Qualification et expériences des scientifiques responsables

Chacun des sites sera supervisé par un ingénieur agronome.

3- Titre du Projet

Programme d'essais aux champs d'hybrides génétiquement modifiés résistants aux insectes Coléoptères et tolérants à l'herbicide glufosinate-ammonium.

4- Développements ultérieurs envisagés

Mise en marché d'hybrides génétiquement modifiés résistants à certains insectes Coléoptères (les chrysomèles des racines du maïs) et tolérants à l'herbicide glufosinate-ammonium.

## **B. INFORMATIONS CONCERNANT L'ORGANISME RECEPTEUR**

### 1- Nom complet

- a) Nom de famille : Gramineae
- b) Genre : Zea
- c) Espèce : mays ( $2n = 20$ )
- d) Sous-espèce : aucune
- e) Cultivar/lignée : hybrides expérimentaux
- f) Nom usuel : maïs

### 2- Reproduction/compatibilité sexuelle

#### a) Information concernant la reproduction

##### i. mode(s) de reproduction

Le maïs est une plante monoïque anémophile possédant deux inflorescences distinctes :

- Les fleurs mâles, groupées en panicule au sommet de la tige, ne portent que des étamines entourées de glumelles. Elles apparaissent les premières (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 de bractées foliacées (les spathes) qui entourent chaque épi. Chaque fleur contient un ovaire unique.

##### ii. le cas échéant, facteurs spécifiques affectant la reproduction

La pollinisation du maïs en conditions naturelles se réalise principalement par fécondation croisée (taux supérieur à 95%). Un faible taux d'autofécondation est néanmoins possible (inférieur à 5%). Le maïs est une espèce typiquement allogame.

L'émergence de la panicule, l'émergence des soies et la pollinisation sont les stades les plus critiques du développement du maïs et le stress hydrique ou les dysfonctionnements au niveau de la fertilité ont un fort impact sur le rendement de grain. Généralement, la viabilité du pollen de maïs est courte. Dans des conditions de températures élevées et de dessiccation, la viabilité du pollen de maïs est mesurée en minutes ; ces conditions peuvent même abîmer la panicule avant que du pollen viable

soit émis. Des conditions plus modérées peuvent rallonger la durée de vie du pollen dans le champ de plusieurs heures.

### iii. Temps de génération

Le maïs est une plante annuelle avec un cycle de culture pouvant varier de 10 semaines (au plus court) à 48 semaines (au plus long) du semis au stade de maturité. Cette divergence de temps de maturation permet de cultiver le maïs dans diverses conditions climatiques.

Dans les conditions françaises les semis ont lieu à partir d'avril jusqu'au 15 mai et la récolte peut intervenir de début septembre (maïs utilisé en fourrage) jusqu'à mi-décembre (pour le maïs grain le plus tardif).

### b) Compatibilité sexuelle 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.

## 3- Capacité de survie

### a) Capacité à former des structures de survie ou de dormance

Le maïs est une plante annuelle sans dormance et les graines sont les seules structures de survie. La survie des graines de maïs dépend de la température, de l'humidité des graines, du génotype, de la protection de l'enveloppe et du stade de développement. En règle générale, seuls les épis non battus peuvent permettre aux grains de conserver éventuellement une capacité de germination l'année suivante.

### b) Facteurs spécifiques affectant la capacité de survie

Il n'y a en général pas de repousses à la suite d'une culture de maïs. Lorsque des repousses apparaissent dans les jours qui suivent la récolte les plantules sont ensuite détruites par le froid de l'hiver. De ce fait les repousses n'atteignent pas le stade reproductif.

Le gel a un effet négatif sur la germination des graines de maïs et a été identifié comme un risque majeur dans la production de graines de maïs. Les températures supérieures à 45°C ont également été constatées comme ayant un effet destructeur sur la viabilité des graines de maïs. Les

pratiques agricoles courantes conduisent également à la destruction des graines ou des éventuelles repousses.

#### 4- Dissémination

##### a) Forme et étendue de la dissémination de la plante réceptrice

Le maïs en Europe n'est qu'une espèce de grande culture, sa dissémination n'intervient que dans les espaces agricoles par semis. La France possède la plus grande surface cultivée de maïs de la Communauté Européenne.

##### b) Facteurs spécifiques affectant la dissémination

La dissémination 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. La durée de floraison des fleurs mâles est de 6 à 10 jours.

La dispersion des graines est généralement limitée aux champs cultivés. Les propriétés inhérentes au maïs, l'existence de spathes enserrant l'épi et la fixation des graines sur la rafle (axe central de l'épi), réduisent de fait la possibilité de dispersion naturelle des graines. La viabilité des semences est fortement limitée car elles sont très sensibles aux maladies et au froid hivernal. C'est pourquoi il n'y a en général pas de repousses de maïs.

#### 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 troisième 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 Bretagne et Poitou-Charentes,
- L'Est avec notamment les régions Rhône-Alpes et Alsace,
- La zone Nord-Loire (Centre, Ile-de-France, Picardie, Champagne-Ardenne...).

- 
- 6- Description de l'habitat naturel de la plante, pour les plantes ne poussant pas dans la communauté européenne, y compris les informations sur les prédateurs naturels, les parasites, les concurrents et les symbiotes

Le maïs est une plante originaire d'Amérique centrale qui ne se développe pas en dessous de 9-10°C et qui a une température optimale de croissance de 30-33°C. En climat continental (Canada, Russie), le maïs est cultivé jusqu'au 60<sup>ème</sup> parallèle. Le maïs peut pousser dans tous les pays de la Communauté Européenne mais les plus grandes zones de culture se trouvent par ordre d'importance : en France, en Allemagne, en Italie, en Espagne, au Benelux, en Grèce, au Portugal, en Angleterre, en Irlande, au Danemark et en Suède.

- 7- Interactions potentielles significatives de la plante avec les organismes autres que des plantes dans son écosystème naturel, y compris les informations sur la toxicité pour les hommes, les animaux et les autres organismes

On sait que le maïs a une interaction avec d'autres organismes dans l'environnement tels que les insectes, les oiseaux et les mammifères. Le maïs est sensible aux maladies dues aux champignons (anthracnose, helminthosporiose, fusariose, charbon, mildiou) et aux insectes ravageurs (atomaire, blianiule, chrysomèle, scutigérelle, taupin, tipule, vers gris, cicadelle, noctuelle, sésamie, pyrale, puceron), et également à la compétition des mauvaises herbes environnantes.

Le maïs est une espèce de grande culture et, historiquement, son utilisation ne présente pas de danger.

## C. INFORMATIONS CONCERNANT LA MODIFICATION GÉNÉTIQUE

*Ce chapitre contient des informations qui doivent rester confidentielles pour des motifs de concurrence et de propriété intellectuelle.*

### 1- Description de la méthode utilisée pour la modification génétique

De nouveaux gènes ont été introduits dans le génome de maïs grâce à une méthode de transformation par *Agrobacterium*. *Agrobacterium tumefaciens* a en effet la capacité de transmettre un fragment d'ADN à des cellules végétales.

### 2- Nature et source du vecteur utilisé

Le vecteur utilisé pour produire l'événement de transformation objet de cette demande est un plasmide de l'*Agrobacterium tumefaciens* rendu non pathogène en lui supprimant son ADN-T natif. Le site ADN-T sur le plasmide Ti contient à la place les gènes de résistance aux insectes Coléoptères et le gène de tolérance à l'herbicide glufosinate, ainsi que les éléments de régulation nécessaires à leur expression.

Les informations plus détaillées concernant la taille, l'origine et la fonction voulue de chaque fragment constituant de la région envisagée pour le transfert ont été fournies aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire chargée de l'évaluation de cette demande mais ne sont pas disponibles ici compte tenu des obligations liées à la protection de la propriété industrielle.

## D. INFORMATION CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE

*Ce chapitre contient des informations qui doivent rester confidentielles pour des motifs de concurrence et de propriété intellectuelle.*

### 1- Description des traits et caractéristiques qui ont été introduits

De nouveaux gènes ont été introduits dans les plantes de maïs afin qu'elles puissent se défendre contre les attaques d'insectes auxquels elles sont sensibles.

Les hybrides de maïs génétiquement modifiés avec l'événement de transformation objet de cette demande présentent une résistance à certains insectes Coléoptères grâce à l'introduction de gènes isolés de la bactérie *Bacillus thuringiensis* présente dans le sol. Les plantes transgéniques produisent deux protéines qui en combinaison forment une protéine cristalline efficace pour contrôler certains insectes Coléoptères au stade larvaire de croissance tels que les chrysomèles des racines, *Diabrotica virgifera virgifera* et *Diabrotica barberi*.

De plus, un autre gène a été introduit comme marqueur afin de pouvoir sélectionner les cellules transformées. Ce gène marqueur confère aux plantes régénérées une tolérance à l'herbicide glufosinate d'ammonium. La protéine qui est synthétisée acétyle la phosphinothricine, ingrédient actif de l'herbicide glufosinate d'ammonium. La phosphinothricine est ainsi convertie en une forme inactive qui n'est plus toxique pour les plantes de maïs, ce qui leur confère une tolérance à l'herbicide.

### 2- Information sur les séquences réellement transférées (insert)

Les informations plus détaillées concernant les séquences réellement transférées, la taille et la structure de l'insert, les méthodes utilisées pour sa caractérisation, sa localisation dans la cellule, le nombre de copies de l'insert ont été fournies aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire chargée de l'évaluation de cette demande mais ne sont pas disponibles ici compte tenu des obligations liées à la protection de la propriété industrielle.

### 3- Information concernant l'expression de l'insert

- a) Informations concernant l'expression de l'insert et les méthodes utilisées pour sa caractérisation

L'expression de l'insert a pu être évaluée par analyses immunoenzymatiques de type ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

Les résultats montrent que l'expression des gènes introduits est confirmée dans les plantes modifiées par l'événement de transformation objet de cette demande. L'expression de ces gènes n'a été détectée dans aucun échantillon de plantes non modifiées.

- b) Parties de la plante où l'insert est exprimé (par exemple la racine, la tige, le pollen, etc.)

Les gènes conférant la résistance aux insectes Coléoptères et la tolérance à l'herbicide glufosinate sont sous le contrôle de promoteurs constitutifs.

### 4- Description des différences entre la plante supérieure génétiquement modifiée et la plante réceptrice

- a) Dissémination

Les plantes génétiquement modifiées ont le même comportement vis à vis de l'émission de pollen et de la production de graines que leurs équivalents non modifiés. Leur comportement de reproduction est identique.

- b) Capacité de survie

La capacité de survie est la même, la plante génétiquement modifiée reste une plante annuelle. Les gènes introduits n'ont pas d'effet sur les aptitudes à coloniser de la plante. Le maïs, dans les conditions européennes, ne peut pas s'implanter en dehors des zones cultivées et de toute façon, même si des repousses apparaissaient après récolte, elles seraient endommagées par le gel de l'hiver : il n'y aurait donc pas

production de plantes capables de se reproduire. Malgré cela, une surveillance d'un an après la dissémination sera réalisée pour détruire toute repousse si cela s'avérait nécessaire.

#### 5- Stabilité génétique du ou des inserts

La ségrégation mendélienne de l'insert dans le maïs transformé avec l'événement de transformation objet de la demande a été analysée sur plusieurs générations distinctes obtenues par retro croisements de la plante contenant l'événement de transformation avec une lignée élite.

Les résultats confirment l'évidence d'une hérédité stable du matériel génétique introduit au niveau nucléaire, au fil des générations.

#### 6- Possibilité de transfert du matériel génétique des plantes génétiquement modifiées dans d'autres organismes

##### - Transfert horizontal

Aucune publication ne donne de preuve quant à l'existence de quelques mécanismes naturels que ce soit, par lesquels des gènes peuvent être transférés d'une plante de maïs à un autre organisme. Ceci est confirmé dans la conclusion du bilan des activités réalisées au cours des années 1999 et 2000 pour le compte du Comité de Biovigilance concernant le transfert d'un gène inséré dans une plante de maïs vers les microorganismes du sol.

Seuls des croisements entre des plantes de maïs sont possibles.

##### - Transfert interspécifique ou intergénérique

Il n'existe aucun transfert interspécifique ou intergénérique puisqu'il n'y a pas d'espèces apparentées en Europe.

##### - Transfert intraspécifique

Les plantes génétiquement modifiées ont le même comportement vis à vis de l'émission de pollen que leurs équivalents non modifiés. Dans cette expérimentation nous allons ensacher ou castrer les panicules de toutes les

plantes transgéniques de façon à éliminer les risques dus à la dissémination du pollen.

#### 7- Informations concernant les effets toxiques ou nocifs de la modification génétique sur la santé publique et l'environnement

Les souches de *Bacillus thuringiensis* actuellement commercialisées n'ont démontré aucune toxicité ni pathogénicité envers les mammifères. Des recherches d'homologies avec des bases de données de gènes standards et de protéines n'ont révélé aucune homologie significative entre les protéines conférant la résistance aux insectes Coléoptères ou la protéine conférant la tolérance à l'herbicide glufosinate et des allergènes de protéines connus.

Les plantes transgéniques qui font l'objet de cette demande ont été testées dans plusieurs essais aux Etats-Unis et à notre connaissance, aucun effet nocif pour la santé humaine et l'environnement n'a été rapporté.

De plus, le produit de la récolte ne sera pas consommé et il n'y aura donc pas d'exposition pour les humains.

#### 8- Mécanismes d'interaction entre la plante génétiquement modifiée et l'organisme cible s'il y a lieu

Les hybrides de maïs génétiquement modifié qui présentent une résistance aux insectes Coléoptères produisent deux protéines nécessaires à l'activité insecticide. Les gènes codant ces protéines ont été isolés d'une lignée de *Bacillus thuringiensis* et il a été démontré que ces protéines sont efficaces spécifiquement pour le contrôle de certains insectes Coléoptères, tels que les chrysomèles des racines *Diabrotica virgifera virgifera* et *D. barberi*, dans leur stade de croissance larvaire. Lorsque ces larves de Coléoptères se nourrissent de ce maïs, elles sont exposées à ces protéines insecticides et il en résulte des effets histo-pathologiques sur les cellules épithéliales de leur intestin, suivi de la mort de l'insecte.

## 9- Interactions potentiellement significatives avec des organismes non cibles

L'activité des protéines contrôlant l'insecte est spécifique de certaines larves de Coléoptères qui se nourrissent de maïs. Pour les plantes de maïs génétiquement modifié avec ces gènes conférant la résistance à certains insectes coléoptères et la tolérance à l'herbicide glufosinate d'ammonium, il n'y a pas d'interactions potentiellement significatives connues avec des organismes non cibles.

De plus, étant donné la taille de l'essai, les potentialités de contact avec des organismes non cibles sont extrêmement réduites.

## 10-Description des méthodes de détection et d'identification de la plante génétiquement modifiée :

- Techniques de description phénotypique

Le maïs est une espèce de la famille des Gramineae et a été largement caractérisé par sa taxonomie, ce qui permet de l'identifier visuellement.

L'identification de la plante transformée est faisable par bio-test en donnant des échantillons de tissus provenant de ces plantes à des larves de Coléoptères, notamment la Chrysomèle des racines du maïs (*Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica barberi*) ou bien en testant la tolérance des plantes à l'herbicide glufosinate-ammonium.

- Techniques de description génotypique (mise en évidence des séquences spécifiques dans le génome des plantes)

L'identification des gènes introduits peut être faite à l'aide d'analyses PCR (amplification de l'ADN par réactions polymérase en chaîne) ou Southern blot (digestion de l'ADN avec des enzymes de restriction, électrophorèse, transfert sur membrane et hybridation avec des sondes spécifiques).

## 11-Information, le cas échéant, sur les précédentes disséminations de la plante génétiquement modifiée

Depuis 1999, de nombreux essais ont déjà eu lieu en Amérique du Nord et du Sud pour l'expérimentation aux champs d'hybrides de maïs génétiquement modifié pour la résistance aux Coléoptères (*Diabrotica*). Aucun effet non intentionnel n'a été rapporté.

Par ailleurs, l'expérimentation aux champs d'hybrides de maïs génétiquement modifiés par un événement de transformation issu de la même construction génétique a déjà été réalisée en France et dans d'autres pays d'Europe en 2000 et 2001. Aucun effet non intentionnel lié à ces expérimentations n'a été rapporté.

## **E. CARACTERISATION DU SITE DE DISSEMINATION**

### 1-Localisation et étendue des sites de dissémination

Les plantes génétiquement modifiées objets de cette demande d'expérimentation au champ seront implantées sur deux sites d'essais en 2002 (Vallée de Garonne, Midi-Pyrénées). La surface occupée par les plantes génétiquement modifiées par cet événement de transformation sera de 110m<sup>2</sup> sur chaque site, la surface totale de l'essai étant bien supérieure (de l'ordre de 2000 m<sup>2</sup> pour chacun des sites).

Dans les années futures, il pourrait y avoir jusqu'à quatre sites, chacun semé avec une surface de plantes génétiquement modifiées par cet événement de transformation ne dépassant pas 1000m<sup>2</sup>.



### 2-Description des écosystèmes concernés y compris le climat, la flore et la faune



Les lieux d'essai sont situés dans des zones de culture traditionnelle du maïs. Ces sites sont tous dans la zone sud de climat océanique de la France. La faune et la flore n'ont pas de caractéristiques particulières et les champs qui seront choisis ne sont pas situés dans des zones protégées ou à proximité de celles-ci.



### 3-Présence d'espèces végétales apparentées sauvages sexuellement compatibles ou d'espèces cultivées sexuellement compatibles



On ne trouve pas d'espèces apparentées sexuellement compatibles en France ou en Europe.



### 4-Proximité du site de biotopes officiellement reconnus ou de zones protégées susceptibles d'être affectées

Les sites choisis pour cet essai se situeront dans une zone agricole qui n'est pas à proximité de biotopes officiellement reconnus ou de zones protégées.

## **F. INFORMATION CONCERNANT LA DISSEMINATION**

### **1- Objectif de la dissémination**

Le programme d'essais a pour but l'évaluation d'hybrides de maïs génétiquement modifiés résistants aux insectes Coléoptères et tolérants à l'herbicide glufosinate. L'objectif est de collecter des données concernant la composition des différents organes de la plante génétiquement modifiée et l'expression des protéines produites en comparaison avec l'hybride équivalent non génétiquement modifié.

Ce programme sera réparti en 2002 sur deux sites de dissémination chacun sous la responsabilité d'un ingénieur agronome.

### **2- Date et durée prévues de l'opération**

Il est envisagé de réaliser l'expérimentation durant 4 campagnes de culture du maïs (2002 à 2005), chacune allant du 15 avril au 15 décembre approximativement.

### **3- Méthode de dissémination envisagée**

Le semis se fera grain à grain en lignes espacées de 70 à 80 cm, la longueur de chaque ligne étant approximativement de 7,5 mètres. Aux extrémités des lignes, des allées seront pratiquées pour faciliter l'accès aux plantes.

L'essai sera entouré de quatre rangs de maïs conventionnel qui seront également détruits à la fin de l'essai.

### **4- Préparation et gestion du site avant, pendant et après la dissémination, y compris les pratiques culturales et méthodes de récolte**

La préparation et la gestion du site seront réalisées dans les conditions habituelles nécessaires à la bonne conduite des essais de maïs. Pour les besoins de l'étude les échantillons seront récoltés manuellement. Les

éléments végétaux qui n'auront pas été récoltés pour être utilisés dans les analyses seront détruits par hachage et enfouissement sur le site.

Après la dissémination la parcelle sera visitée régulièrement pendant l'année suivante pour surveiller les repousses. La culture suivante, autre qu'une culture de maïs commercial, sera menée dans les conditions culturales habituelles, avec en particulier l'utilisation d'herbicide différent du glufosinate.

#### 5- Nombre approximatif de plantes

La densité de peuplement sera approximativement de 60 000 plantes/ha.

### **G. INFORMATION SUR LES PLANS DE SURVEILLANCE, DE CONTROLE ET DE TRAITEMENT DU SITE ET DES DECHETS APRES DISSEMINATION**

#### 1-Précautions prises

- a) Distances des autres espèces végétales sexuellement compatibles

Il n'y a pas d'espèces végétales sexuellement compatibles susceptibles de se croiser avec le maïs en Europe.

- b) Mesures visant à minimiser ou à empêcher la dissémination du pollen ou des graines

La dissémination du pollen des plantes transgéniques sera contrôlée afin d'éviter que le pollen n'aille féconder d'autres plantes. Ce contrôle sera effectué soit par castration manuelle, c'est-à-dire destruction des panicules mâles avant émission de pollen, soit par la pose sur les panicules avant floraison, de sacs qui retiendront le pollen. Ces sacs seront maintenus sur les plantes pendant la durée d'émission du pollen et seront détruits avec les panicules en fin de floraison.

Les graines sur l'épi de maïs ne peuvent pas se disperser. Elles sont insérées sur une rafle et protégées par de nombreuses spathes (prolongements foliaires) qui protègent les graines d'un contact extérieur. Dans le cadre de l'expérimentation, certaines graines seront prélevées pour des analyses par prélèvement de l'épi entier puis destruction du reste de l'épi et des graines non utilisées.

## 2-Description des méthodes de traitement du site après dissémination

En fin de dissémination tous les éléments végétaux qui n'auront pas été récoltés pour être utilisés dans les analyses seront détruits par hachage et enfouissement sur le site.

L'apparition de repousses fera l'objet d'une surveillance durant l'année suivant la dissémination. Pendant la jachère hivernale, un traitement par un herbicide adapté (différent du glufosinate) sera effectué afin d'assurer leur éventuelle destruction.

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

Les échantillons de plantes prélevés pour analyse seront conservés dans un laboratoire ayant reçu un agrément de la Commission de Génie Génétique. Les résidus des plantes ayant servi aux analyses seront incinérés.

Les déchets des plantes génétiquement modifiées produites par la dissémination, non récoltés, seront détruits par enfouissement sur le site.

## 4-Description des plans et techniques de surveillance

Les sites seront visités régulièrement pour les besoins agronomiques et expérimentaux. Ces visites seront mises à profit pour observer le développement des plantes et vérifier la non dispersion de matériel.

Ces essais font également l'objet d'un suivi et de visites par les agents assermentés de la Protection des Végétaux pour vérifier la conformité de la dissémination par rapport aux conditions de l'autorisation.

## 5-Description des plans d'urgence

Le suivi régulier des essais permet d'identifier de façon précoce tout événement ou développement qui n'est pas souhaitable.

Si nécessaire, l'essai pourrait être détruit par application d'un herbicide total autre que le glufosinate ou par destruction mécanique et enfouissement.

## **H. INFORMATION SUR LES EVENTUELLES INCIDENCES DE LA DISSEMINATION DES PLANTES GENETIQUEMENT MODIFIEES SUR L'ENVIRONNEMENT**

- 1-Probabilité des plantes supérieures génétiquement modifiées à devenir plus persistantes que les plantes parentales ou réceptrices dans les habitats agricoles ou à se propager plus rapidement dans les habitats naturels

Le maïs n'est pas persistant dans les habitats agricoles et la transformation testée ne change pas ce comportement.

- 2-Avantages ou inconvénients sélectifs conférés aux autres espèces végétales sexuellement compatibles, qui peuvent résulter du transfert de matériel génétique de la plante génétiquement modifiée

Il n'existe pas d'autres espèces sexuellement compatibles en ce qui concerne le maïs en Europe.

- 3-Incidence écologique éventuelle de l'interaction entre la plante génétiquement modifiée et les organismes cibles (le cas échéant)

Les organismes cibles sont les Coléoptères sensibles aux protéines de *Bacillus thuringiensis*. Le seul changement envisageable, avec une probabilité infime, est le développement d'une résistance de ces Coléoptères à ces protéines, ce qui peut aussi se produire quand on utilise des moyens de lutte biologique ou chimique. Si ce phénomène se produisait, le seul inconvénient serait de rendre ces plantes génétiquement

modifiées inopérantes vis à vis des Coléoptères. Cependant, vu les conditions des essais, cela semble tout à fait improbable.

#### 4-Incidence écologique éventuelle de l'interaction entre la plante génétiquement modifiée et les organismes non cibles (le cas échéant)

Il n'y a pas d'interactions potentiellement significatives connues avec des organismes non cibles. De plus, vu la taille de l'essai, toute incidence écologique est peu probable.

