

SOCIETE BIOGEMMA

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

**Essais en champ pluriannuels et multilocaux d'un
maïs génétiquement modifié présentant une
meilleure digestibilité**

BIOGEMMA-GENOPLANTE
5, rue Saint-Germain l'Auxerrois
75001 PARIS
mars 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 vient d'être modifiée le 21 avril 2001 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 cet événement de transformation ; il fait suite à de nombreuses expérimentations en serre. Il permettra de confirmer, dans des conditions agronomiques normales, le bon fonctionnement du caractère modifié dans plusieurs générations de plantes différentes.

Conformément à 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

Préambule	2
Introduction	6
A. Informations administratives générales	11
A.1 Nom et adresse du notifiant	11
A.2 Qualification et expérience des responsables scientifiques	11
A.3 Titre du projet	11
A.4 Développements ultérieurs envisagés	11
B. Caractéristique biologique de l'espèce végétale réceptrice	12
B.1 Position taxonomique	12
B.2 Mode de reproduction et compatibilité sexuelle avec la flore	12
B.2a Information concernant la reproduction du maïs	12
B.2b Compatibilités sexuelles avec d'autres espèces sauvages ou cultivées	13
B.3 Capacité de survie	13
B.3a Capacité à former des structures de survie ou de dormance	13
B.3b Facteurs spécifiques affectant la capacité de survie	13
B.4 Dissémination	13
B.5 Distribution géographique de la plante	13
B.6 Description de l'habitat naturel de la plante	14
B.7 Interactions avec des organismes autres que les plantes	14
C. Transformation génétique des plantes	14
C.1 Méthode de transformation	14
C.2 Nature et source des vecteurs utilisés	14
C.3 Taille, origine et fonction voulue de chaque fragment constituant de la région envisagée pour le transfert	15
D. Le matériel transgénique	15
D.1 Traits et caractéristiques introduits	15
D.2 Informations sur les séquences réellement transférées	15
D.3 Informations concernant l'expression de l'insert	16
D.4 Description des différences entre la plante supérieure génétiquement modifiée et la plante réceptrice	16
D.5 Stabilité génétique des inserts	17
D.6 Possibilité de transfert de matériel génétique des plantes génétiquement modifiées dans d'autres organismes	17
D.7 Toxicité ou effet nocif pour la santé publique et l'environnement de la modification apportée	17
D.8 Interactions significative avec des organismes non-cibles	18
D.9 Description des méthodes de détection et d'identification de l'OGM	18
D.10 Historique des précédentes disséminations	18
E. Localisation des sites de dissémination	19
E.1 Localisation et étendue des sites de dissémination	19
E.2 Description des écosystèmes concernés	19
E.3 Espèces végétales cultivées ou apparentées sauvages sexuellement compatibles	19
F. Information concernant la dissémination	19

F.1 Objectif de la dissémination	19
F.2 Date et durée de l'opération	20
F.3 Méthode de dissémination	21
F.4 Préparation et gestion du site avant, pendant et après la dissémination	21
F.5 Nombre approximatif de plantes	21
G. Mesures de prévention de dispersion	21
G.1 Précautions prises	21
G.2 Description des méthodes de traitement du site après dissémination	22
G.3 Description des méthodes de traitement après dissémination pour le matériel issu de plantes génétiquement modifiées, y compris pour le traitement des déchets	22
G.4 Description des plans et techniques de surveillance	22
G.5 Description des plans d'urgence	22
H. Information sur les éventuelles incidences de la dissémination sur l'environnement	23
H.1 Probabilité des plantes supérieures génétiquement modifiées à devenir plus persistantes dans les habitats agricoles	23
H.2 Avantages ou inconvénients sélectifs conférés par transfert de gènes aux autres espèces sexuellement compatibles	23
H.3 Incidences des interactions avec les organismes non-cibles (absence d'organismes cibles)	24

Les travaux qui ont conduit à l'obtention de ces plantes transformées ont été menés dans le cadre du programme **Génoplante**, entre **Biogemma** et l'**INRA**.

Les expérimentations en champ seront conduites à la fois par l'INRA et par Biogemma.

INTRODUCTION

Le maïs est une espèce cultivée sur un peu plus de trois millions d'hectares en France dont 1 400 000 ha de maïs fourrage utilisé en ensilage pour l'alimentation animale. Si l'on tient compte des productions de maïs grain destinées à l'alimentation animale, plus des trois quarts de la production sont destinés à cet usage. Au niveau de l'union Européenne, 50 % des productions concernent le maïs ensilage. Le reste de la production de maïs grain est ensuite transformé industriellement (amidonnerie, semoulerie) pour des usages en alimentation humaine et dans l'industrie.

L'ensilage de maïs présente pour l'agriculteur de nombreux intérêts. Produit à partir d'une culture dont le rendement est élevé, il contribue à une meilleure viabilité économique des petites exploitations. La récolte et le stockage du produit sont aisés, donnant un aliment d'une qualité énergétique et nutritionnelle stable, dont l'équilibre peut être obtenu par la complémentation à l'aide d'autres ensilages de fourrage ou de tourteaux de soja. Il permet, dans bien des exploitations, de nourrir les animaux 9 mois sur 12.

Ses qualités nutritionnelles permettent la persistance de la production laitière. Ainsi, un mélange d'ensilage de maïs et d'ensilage de fourrage permet de valoriser l'utilisation des protéines du fourrage dont la solubilité (50%) est très élevée et très rapide au niveau du rumen de la vache. Le faible contenu en calcium et en potassium de l'ensilage de maïs permet de diluer l'importante teneur de ces éléments dans l'ensilage de fourrage, notamment ceux de l'ensilage de légumineuses et d'obtenir un équilibre quasi parfait entre l'énergie et les protéines du début à la fin de la lactation. L'ensilage est souvent un élément qui aide l'éleveur à maîtriser le synchronisme énergie-protéine.

Un des objectifs de la sélection variétale chez le maïs consiste à augmenter l'énergie nette de ce type d'aliment. Pour cela, une première approche consiste à rechercher un meilleur rendement grainier, afin d'augmenter les quantités d'amidon, de sucres simples et d'huile, assimilables à près de 100 %. Mais l'augmentation de la teneur en amidon atteint une limite physiologique pour l'animal. Au-delà de 30 % d'amidon dans l'ensilage, il y a des risques forts d'acidose pour les vaches. Il est donc nécessaire d'augmenter la digestibilité des composés de la paroi végétale à commencer par les polysaccharides (hemicelluloses et cellulose) représentant environ 50% de la masse végétale et assimilables à un taux de l'ordre de 50 %. La lignine, qui est solubilisée à 5% environ, est le principal facteur limitant la dégradation des parois végétales, par les inter-relations physiques et chimiques complexes qui s'établissent entre ses différents constituants. L'augmentation de la lignification au cours de la maturation de la plante provoque une diminution de la digestibilité de cette plante.

Un facteur important de diminution de digestibilité du maïs fourrage est ainsi lié à la présence dans les parois des cellules végétales de composés phénoliques, en particulier des lignines. Les lignines établissent différents types de liaisons avec les autres constituants pariétaux pour former un maillage serré qui gêne l'accessibilité aux enzymes digestives des glucides, principale source d'énergie pour les herbivores. La part de résidus non digérés varie au cours du développement de la plante. Selon leur stade de maturité les plantes ne possèderaient pas le même type de lignines déposées sur leurs parois cellulaires. Cependant, la valeur énergétique d'une plante fourragère (quantité d'énergie valorisée par un animal à partir d'un aliment) est liée à la digestibilité des parois par un coefficient de corrélation très fort. Chez le maïs, la valeur énergétique est expliquée à 95 % par la teneur en grain ($r^2 = 0,36$) et la digestibilité des parois ($r^2 = 0,59$), ces deux paramètres étant génétiquement indépendants ($r^2 = 0,02$).

Par conséquent, une des voies privilégiée d'amélioration des qualités du maïs d'ensilage concerne la modification de la composition et de la teneur en lignines des plantes fourragères. En effet, une faible diminution de la teneur en lignine conduit à une forte amélioration de la digestibilité. Différentes expérimentations menées depuis 1990 ont montré qu'une variété plus digeste permet d'augmenter le niveau de production de lait de plus d'un kilogramme et la reprise de poids des vaches jusqu'à plus de 500g/jour par rapport à une variété moins digeste. Ainsi, plus la variété est digeste plus la production laitière est élevée et plus la reprise de poids est importante, ce dernier point étant une nécessité pour assurer la lactation suivante. Ceci étant, l'intérêt d'une variété à digestibilité élevée est aussi de pouvoir réduire les quantités de concentrés pour un niveau de production donné, des reprises de poids de 500g/jour n'étant pas nécessaires.

Les maïs de type « brown midrib », en particulier les maïs *bm3*, possèdent une digestibilité fortement augmentée par rapport aux maïs n'ont pas cette mutation. Ils améliorent significativement les quantités ingérées et la production laitière. Ces maïs *bm3* diffèrent des maïs "normaux" par une teneur fortement réduite en lignine (jusqu'à 40%). Cependant, les inconvénients des maïs *bm3* tels qu'un rendement en champ moindre, une susceptibilité à la verse accrue, un manque de croissance et de vigueur en début de végétation et un retard à la floraison, en empêchent l'exploitation.

Ainsi, la modification voire l'interruption de la voie de biosynthèse des lignines est une solution pour obtenir des plantes plus digestes.

La lignine est un composé majeur de la paroi des cellules du sclérenchyme et du xylème des plantes vasculaires. Elle joue un rôle important dans les fonctions conductrices du xylème en réduisant la perméabilité hydrique des parois cellulaires. Dans les tissus lignifiés, elle intervient comme agent de liaison intercellulaire. Elle est responsable de la rigidité des parois cellulaires et du port dressé des végétaux et participe à la résistance des plantes aux agressions biotiques ou abiotiques.

La structure et la composition de ce réseau de lignines varient entre les espèces végétales, entre les types cellulaires au sein d'une même plante, entre les différentes parties de la paroi d'une même cellule et selon le stade de développement. La diversité de composition et de structure des lignines et la complexité de la voie de biosynthèse ralentissent la compréhension de la structure des lignines et de leurs voies de biosynthèse.

La lignine est un polymère insoluble de 3 monomères d'alcools ou monolignols : l'alcool p-coumarylique (sous-unités H), l'alcool coniférylique (sous-unités G) et l'alcool sinapylique (sous-unités S). Grâce aux études menées avec des traceurs et aux analyses enzymatiques des étapes intermédiaires, il a été montré que les monolignols dérivent de la voie des phénylpropanoïdes. Chaque type de précurseurs peut former une variété de liaisons avec d'autres précurseurs et ainsi constituer la lignine. D'autres liaisons peuvent également s'établir avec d'autres composés pariétaux (polysaccharides et protéines) pour former un réseau complexe tridimensionnel.

Bien que la voie de biosynthèse des lignines (figure 1) soit beaucoup étudiée, de nombreuses étapes sont encore incomprises. Les principales étapes de cette voie de biosynthèse sont l'hydroxylation, la O-méthylation des cycles aromatiques puis la conversion de la chaîne latérale carboxyl en une fonction alcool.

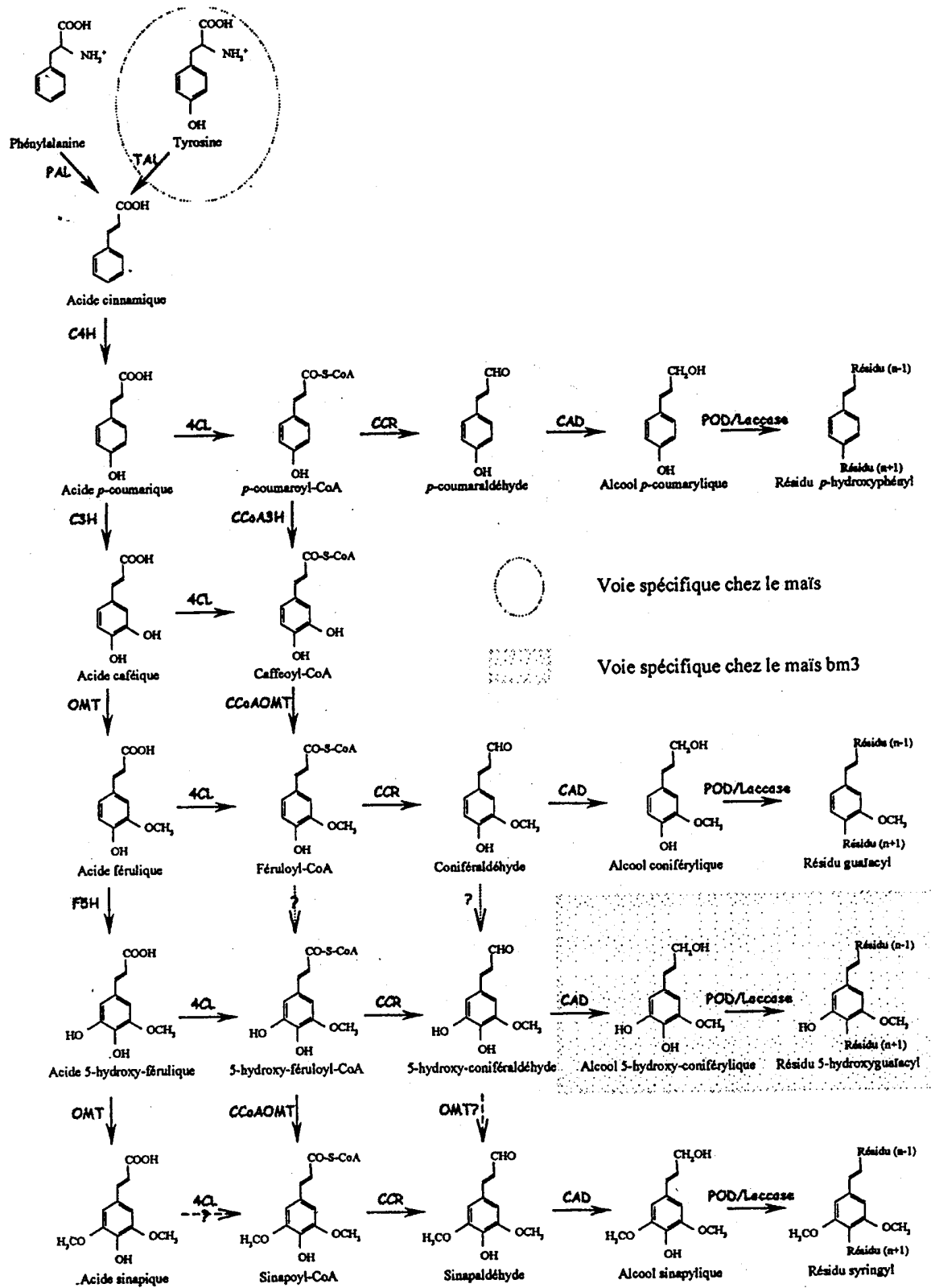
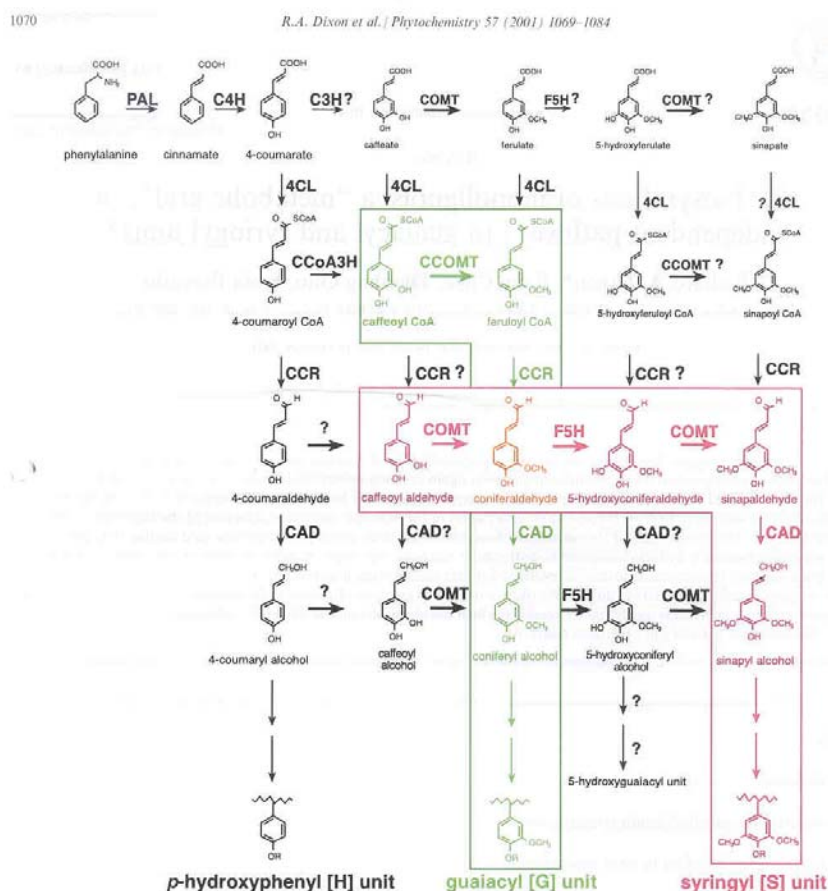


Figure 1 : La voie de biosynthèse des lignines

L'hypothèse actuelle de la voie de biosynthèse des monolignols considère que le réseau métabolique aboutissant à la formation des sous-unités S et G fait intervenir des réactions successives d'hydroxylation et de O-méthylation à différents niveaux de l'oxydation de la chaîne latérale. Les enzymes du réseau métabolique incluent :

- des O-méthyltransférases distinctes ou non : la caffeic acid 3-O-méthyltransférase (C-OMT), la 5-hydroxyconiferyl aldéhyde O-méthyl transférase (AldOMT), dont l'unicité ou la distinction n'est pas claire, en particulier chez le maïs, et la caffeoyl coenzyme A 3-O méthyltransférase (CCoAOMT), qui est clairement distincte de la ou des deux précédente(s).
- des hydroxycinnamate coenzyme A ligases (4CL),
- une férulate 5-hydroxylase (F5H) à cytochrome P450,
- et plusieurs isoformes de cinnamoyl Co A réductase (CCR) et de cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD).

La C-OMT permettrait la méthylation des formes libres d'acides hydroxycinnamiques : l'acide caféique et l'acide 5-hydroxyférulique en introduisant respectivement un ou deux groupes méthoxy dans les monomères de lignines. Récemment, il a été montré que le coniféraldéhyde empêche la biosynthèse de l'acide 5-hydroxyférulique dans les tissus lignifiés et que la forme hydroxylée de coniferyl aldéhyde (le 5-hydroxyconiféraldéhyde) est un substrat alternatif préférentiel de la C-OMT, qui fonctionne ainsi en AldOMT. Ainsi, la C-OMT, qui interviendrait dans la biosynthèse de l'acide férulique à partir de l'acide caféique, serait soumise à des régulations spatio-temporelles différentes, et pourrait de plus être différente de l'OMT qui fonctionne en AldOMT (voir aussi le schéma ci dessous proposé par Dixon, 2001).



Pathways to monolignols. The complete metabolic grid of reactions is shown. All enzyme reactions shown with a solid arrow have been demonstrated to occur in vitro. Reactions shown in smaller type may not occur in vivo. The reactions shown in green seem the most likely route to G lignin in vivo. The reactions in red represent those reactions consistent with both in vivo and in vitro evidence for being involved especially in S lignin biosynthesis. The intermediate in orange is common to both G and S lignin pathways

La fonction précise des OMT reste encore imprécise, mais leur implication dans la voie de biosynthèse de la lignine leur confère un rôle certain dans la digestibilité de la plante. Pour préciser cette implication, nous avons produit des plantes de maïs transgéniques dans lesquelles l'expression d'un de ces gènes est réduite par introduction d'une séquence antisens.

Nous proposons de produire, à partir d'une lignée transgénique à expression d'OMT réduite, différents hybrides de maïs et de les cultiver en conditions agronomiques afin de pouvoir analyser les répercussions de cette modification sur la composition et la teneur en lignine ainsi que sur sa digestibilité.

Cette approche de validation en génomique fonctionnelle a pour but d'assigner une fonction à une OMT, afin de mieux connaître son rôle d'un point de vue fondamental et éventuellement d'envisager son utilisation future.

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

Ce dossier s'intègre dans des travaux de recherche développés dans le cadre de Génoplante.

A.2. Qualification et expérience des responsables scientifiques

Les équipes de chercheurs et de techniciens de Biogemma et de l'INRA ont déjà conduit différents essais en champ depuis plusieurs années. Ces essais, sur plusieurs espèces végétales, portaient aussi bien sur des caractères de types agronomiques que des caractères relatifs à la qualité de la graine.

A.3. Titre du projet

Essais en champ pluriannuels et multilocaux de maïs génétiquement modifiés, présentant une meilleure digestibilité.
--

A.4. Développements ultérieurs envisagés

La présente demande concerne la mise en champ d'une variété expérimentale de maïs porteuse de l'événement de transformation 225. Il s'agit de valider le rôle d'un gène particulier, pour lesquels des informations et résultats concordent pour faire supposer qu'il intervient dans les processus de lignification et dans la réduction de digestibilité du maïs utilisé en ensilage.

L'approche utilisée entre dans une logique de génomique fonctionnelle végétale. La validation de la fonction d'un gène se faisant ainsi par l'observation de l'effet phénotypique de son expression dans un fond génétique déficient et/ou de sa sous-expression, par inhibition de son expression, dans un fond génétique où ce caractère est présent. *In fine*, le gène dont la fonction est validée pourra être utilisé soit *via* la transgénèse, soit dans le cadre d'une sélection assistée par marqueurs.

Ce matériel végétal a été produit à des fins de recherche, il n'est pas prévu d'envisager sa commercialisation.

B. CARACTERISTIQUE BIOLOGIQUE DE L'ESPECE VEGETALE RECEPTRICE

B.1. Position taxonomique

	<i>Zea mays ssp. mays</i>
<u>Nom de famille :</u>	Graminae
<u>Genre :</u>	<i>Zea</i>
<u>Espèce :</u>	<i>mays</i>
<u>Sous-espèce :</u>	<i>mays</i>
<u>Lignée :</u>	I2
<u>Nom usuel :</u>	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

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.

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 conditions naturelles se réalise principalement par fécondation croisée (allofécondation supérieure à 95%). Un faible taux d'autofécondation est néanmoins possible (inférieur à 5%).

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.2.b. 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 conditions naturelles. 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 repousses 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

B.4.a. Forme et étendue de la dissémination

Le maïs en Europe n'est qu'une espèce de grande culture, sa dissémination n'intervient que dans les espaces agricoles par semis.

B.4.b. Facteurs spécifiques affectant la 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 repousse 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 (taupins, pyrale et sésamie).

B.7. Interactions avec des organismes autres que des 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 maïs faisant l'objet de ce dossier ont été modifiés génétiquement au laboratoire de l'INRA de Crouelle par transfert d'un fragment d'ADN grâce à la technique de transformation par biolistique.

Les transformations ont été réalisées sur une lignée qui a été sélectionnée pour son aptitude à la transformation génétique. Des particules de tungstène portant l'ADN plasmidique à transférer sont projetées sur des cals de ce génotype de maïs. Les cals sont ensuite cultivés sur un milieu de sélection contenant de la phosphinothricine (ou glufosinate, principe actif des herbicides totaux Basta[®] et Liberty[®]). Des plantules sont alors obtenues, acclimatées en chambre de culture puis en serre et les plantes sont autofécondées. La descendance d'un des transformants obtenus sera utilisée pour l'expérimentation proposée dans ce dossier.

C.2. Nature et source des vecteurs utilisés

Deux vecteurs différents ont été utilisés pour la transformer le maïs par biolistique ; ils sont tous deux dérivés du vecteur pUC.

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

Les constructions génétiques portées par les plasmides utilisés pour le transfert de gènes sont constituées d'un gène marqueur transférant une résistance à un herbicide, et d'une séquence antisens d'un gène OMT de la voie de biosynthèse des lignines. Cette séquence inhibera partiellement le fonctionnement du gène endogène du maïs.

Des informations précises ont été fournies aux experts chargés de l'évaluation de ce dossier. Elles ne figurent pas ici afin de préserver la protection industrielle de ces données.

D. LE MATERIEL VEGETAL TRANSGENIQUE

D.1. Traits et caractéristiques introduits

Les plantes de maïs faisant l'objet de cette demande d'essais au champ présentent une teneur et une composition en lignine modifiée et sont résistantes au glufosinate ammonium (produit herbicide utilisé pour sélectionner les plantules transformées lors des étapes de régénération en culture *in vitro*).

D.2. Informations sur les séquences réellement transférées

Les séquences réellement transférées ont été recherchées par analyse Southern sur des plantes de première et de troisième générations. La caractérisation moléculaire a été effectuée en utilisant différentes sondes moléculaires permettant de démontrer l'insertion dans le génome de la plante des deux gènes, gène d'intérêt et de sélection. Cette caractérisation a permis de montrer que les gènes ont été intégrés d'une façon stable.

Des informations précises ont été fournies aux experts chargés de l'évaluation de ce dossier. Elles ne figurent pas ici afin de préserver la protection industrielle de ces données.

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 par l'observation du phénotype de tolérance au glufosinate et du phénotype de réduction de la teneur en lignine.

Cette réduction de la teneur en lignine entraîne chez cet événement de transformation l'apparition d'un phénotype connu, appelé « brown midrib ». Ce phénotype n'est visible qu'au stade adulte.



A: Plante transgénique présentant le phénotype « brown midrib »
B: Plante non transgénique

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 transgéniques obtenues n'est pas modifié par l'expression du transgène. Lors de leur culture en serre, aucune modification de leur vitesse de reproduction n'a été observée.

D.4.b. Dissémination

La capacité de dissémination des plantes transformées ne semble pas être affectée par la modification. Aucune différence de comportement par rapport à la lignée d'origine n'a été mise en évidence pour les différentes générations déjà cultivées en serre (production de pollen, précocité, morphologie de l'épi...) qui pourrait avoir un éventuel effet sur les performances de dissémination.

D.4.c. Capacité de survie

Cette capacité ne semble pas devoir être affectée : la résistance au glufosinate, utilisée comme marqueur de régénération des plantes génétiquement modifiées, ne présente pas d'avantage sélectif en dehors des pressions de sélection induites par l'application de l'herbicide. Or cet herbicide n'est pas utilisé sur les cultures de maïs,

les plantes faisant l'objet de ce dossier ne présenteront donc pas d'avantage par rapport aux variétés conventionnelles.

D.5. Stabilité génétique des inserts

Les analyses moléculaires et génétiques des transformants primaires présentées ci-dessus nous permettent de confirmer que l'insertion des séquences d'ADN se situe dans les chromosomes du noyau. Cette insertion est stable : les profils d'insertion restent identiques sur plusieurs générations et la ségrégation de type mendélien est observée à chaque génération. L'expression du gène de résistance à l'herbicide est stable sur toutes les générations où elle a été recherchée.

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 de celui de tout autre gène végétal. Des informations supplémentaires sont disponibles, en anglais, 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 ne peuvent être fécondés par le pollen de maïs.

Dans le cas particulier de l'événement 225 faisant l'objet de cette demande, l'émission de pollen par les plantes transgéniques sera limitée par la castration ou par l'ensachage des panicules durant la période de production de pollen. La présence de bordures de plantes non-transgéniques qui constitueront un piège à pollen et la distance d'isolement (dans le cas d'une absence de castration) par rapport aux cultures commerciales de maïs limitera fortement les flux de pollen.

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 au glufosinate (herbicides Basta[®] et Liberty[®]) ainsi qu'un phénotype de composition modifiée de la lignine des parois cellulaires. Ces caractères ne semblent pas devoir s'accompagner de risque particulier.

Une étude a montré que la phosphinotricine acetyltransférase, enzyme qui détoxifie la phosphinotricine (ou glufosinate, principe actif de l'herbicide Basta[®]), et qui est produite à partir du gène marqueur qui a été introduit, est dégradée en quelques secondes par les sucs gastriques humains. Cette protéine, exprimée de façon constitutive dans les plantes, ne semble donc pas pouvoir entraîner de réponse allergique après ingestion.

De façon générale, la composition en lignine est très variable de végétal à végétal et pour un même végétal diffère selon les conditions de culture, les organes et l'âge

des tissus. Dans tous les cas, les végétaux sont consommés, par l'homme ou par l'animal et il n'a pas été rapporté, pour les espèces cultivées, tout comme pour de nombreuses espèces sauvages, de toxicité ou d'effet nocif. La modification de la composition en lignine de l'événement de transformation 225 n'entraîne pas la synthèse de nouvelles unités de base, mais affecte uniquement l'agencement et la quantité du polymère final. Cette composition se rapproche de celle de mutants déjà consommés sans conséquence néfaste (mutants *bm3*).

Les deux gènes introduits ne semblent pas présenter de risque de toxicité particulier. C'est pourquoi aucun risque n'est attendu par rapport à l'ingestion éventuelle de tout ou partie des plantes transgéniques.

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

D.8. Interactions significatives avec des organismes non cibles

Aucune interaction particulière n'est attendue avec les organismes non cibles. La protéine phosphinotricine acetyltransférase n'est pas connue pour présenter de toxicité.

L'inhibition par expression antisens de l'expression d'un gène de la voie de biosynthèse des lignines conduit à une modification de la teneur et de la composition en lignine des parois végétales. Cette modification qui ne conduit pas à la synthèse de composés nouveaux a peu de chances de se traduire par une modification des interactions avec les organismes non-cibles.

L'effet de l'ingestion de parties végétatives de la plante ou de graines par des animaux éventuellement présents sur les sites d'essai peut être considéré sans conséquence vis à vis de ces 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 résistance au glufosinate (résistance aux herbicides Basta[®] et Liberty[®]). Le phénotype de modification de teneur et de composition en lignine n'est appréciable que par analyse biochimique ou éventuellement enzymatique et par le caractère de nervure brune sur les plantes adultes.

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

L'événement de transformation faisant l'objet de cette demande d'essais en champ n'a jamais fait l'objet de dissémination.

E. CARACTERISATION DES SITES DE DISSEMINATION

E.1. Localisation et étendue des sites 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.

Chaque essai devrait couvrir une surface de 4000 m², avec une surface d'environ 1 800 m² couverte par les plantes transgéniques.

E.2. Description des écosystèmes concernés

Les agrosystèmes concernés par l'expérimentation sont dédiés à la polyculture (céréales à paille, tournesol, maïs, ...). Les parcelles envisagées pour la mise en place de ces essais seront selon le cas :

- non nécessairement isolées dans le cas où les panicules de plantes transgéniques seront castrées et les panicules ensachées (pour la production d'hybrides expérimentaux),
- isolées de 200 m de toute culture commerciale de maïs si les plantes transgéniques ne sont pas castrées ou si leur panicule n'est pas ensachée.

Par ailleurs, des bordures agronomiques de maïs non transgéniques seront implantées autour des parcelles et pourront être utilisées comme piège à pollen et comme pollinisateur.

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, les précautions sont prises (respect d'une distance d'isolement ou castration) pour éviter toute dissémination de gènes *via* le pollen à partir des plantes transgéniques en culture.

F. INFORMATION CONCERNANT LA DISSEMINATION

F.1. Objectif de la dissémination

L'objectif général concerne la validation de la fonction d'un gène impliqué dans la voie de biosynthèse des sous-unités de la lignine, polymère qui s'accumule dans les parois végétales, les rendant très partiellement et difficilement digestibles par les animaux.

Les plantes transformées qui seront évaluées présentent, lorsqu'elles sont cultivées en serre, une teneur et une composition en lignine modifiée. La production en conditions agronomiques a pour but de confirmer ces résultats dans des conditions naturelles de culture.

Les conditions de l'environnement influent très fortement sur le développement et la composition des plantes. Les essais préalablement menés en serre ne peuvent donner que des indications grossières sur le caractère étudié. Dans le cas de l'accumulation de lignine, les facteurs physiques de l'environnement (température, éclairage, vent et contraintes mécaniques corrélatives) mais aussi les stress abiotiques (froid, chaleur, sécheresse, ...) peuvent en modifier considérablement les teneurs et les compositions. La lignification est un processus qui s'établit dans le temps. La lignification d'une plante est la résultante d'une somme de réponses aux interactions instantanées entre la croissance, les conditions de croissance, et le potentiel génétique de lignification de cette plante. Ce sont ces conditions de champ qui permettront d'évaluer les effets de la modification de l'expression d'un gène sur l'ensemble du pattern de lignification. Par ailleurs, les conditions de serre ne permettent pas d'évaluer les conséquences d'une hypo-lignification sur le comportement agronomique de la plante. Seuls les essais au champ permettent de mesurer les conséquences possibles d'une hypo-lignification partielle en terme de dépression éventuelle de production, de sensibilité accrue à la verse, de sensibilité accrue à des pathogènes ou à des stress environnementaux.

Les essais proposés pour 2002 ont comme objectifs :

- de produire sur des surfaces réduites des plantes à partir de plusieurs hybrides expérimentaux obtenus en serre. Ces plantes seront analysées (teneurs en lignines, composition et structure) et leur digestibilité sera évaluée par des approches indirectes,
- de produire, toujours à partir de la même lignée transformée, différents hybrides expérimentaux par pollinisation à l'aide d'autres lignées, de comportement variable en digestibilité (faible ou élevée). La production de ces hybrides permet ensuite de faire des analyses fiables, sur un matériel biologique de structure génétique (hybride F1, hétérosis) comparable à celle des variétés cultivées pour les productions d'ensilage.

Ces expérimentations sont effectuées à des fins de recherche et développement.

F.2.Date et durée de l'opération

Pour 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.

F.3.Méthode de dissémination

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

F.4.Préparation et gestion 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 ou anti-limaces sur les sites d'expérimentation.

La récolte des épis et des plantes sera soit manuelle soit mécanique selon la taille et/ou l'objectif de l'expérimentation (production d'hybrides, culture d'hybrides). Ces épis seront mis en sacs ; les sacs identifiés seront rapatriés au laboratoire où le matériel végétal et graines seront conservés jusqu'à leur analyse ou semis.

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 est de 22 000 environ sur chaque lieu d'essai.

G. MESURES DE PREVENTION DE DISPERSION

G.1. Précautions prises

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

Les plantes transgéniques de l'essai seront, selon le cas, castrées ou auront leur panicule ensachée. Leur pollinisation sera assurée par des lignées de maïs non-transgénique ou par leur propre pollen (autofécondation pour la multiplication de la lignée 225). Aucune distance d'isolement ne sera appliquée. Cependant, dans le cas où les plantes ne seraient pas castrées, une distance d'isolement de 200 m sera respectée par rapport aux cultures commerciales de maïs.

4 rangs de bordures agronomiques non transgéniques seront dans tous les cas semés autour de la parcelle ; selon les besoins de l'expérimentation, il pourra s'agir de lignées ou d'hybrides fertiles (pollinisateurs) ou stériles.

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

Le risque de dissémination de pollen transgénique est très fortement réduit puisque les plantes transgéniques cultivées dans cet essai seront castrées pour la

grande majorité ou auront leur panicule ensachée (multiplication de la lignée portant l'événement 225). La dissémination de pollen sera ainsi minimisée. De plus la présence de 4 rangs de bordure agronomique, constitué de plantes de même précocité que les plantes transgéniques, servira de piège à pollen. En fin d'essai, ces plantes seront broyées et les résidus enfouis sur place.

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

Selon la taille et l'objectif des essais, les plantes transgéniques et/ou leurs épis ainsi que les hybrides correspondants, non transgéniques, seront récoltés manuellement ou mécaniquement. Après la récolte, les résidus de plantes (tiges, 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 éventuelle repousse de maïs avant 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, maïs fourrage) sera récolté et transféré dans un laboratoire. Les épis et semences des hybrides expérimentaux produits seront stockés puis utilisés pour des semis ultérieurs en serre ou en champ (campagne 2003 et 2004). Les surplus de matériel végétal seront détruits selon les protocoles en vigueur dans les laboratoires (traitement par la vapeur, incinération, ...).

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 des parcelles seront effectuées et plus particulièrement au printemps pendant la période de germination des graines. Les éventuelles repousses de maïs seront éliminées avant 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 stricte.

H. INFORMATION SUR LES EVENTUELLES INCIDENCES DE LA DISSEMINATION SUR L'ENVIRONNEMENT

H.1. Probabilité des plantes supérieures génétiquement modifiées à devenir plus persistantes dans les habitats agricoles

La modification introduite dans les plantes de maïs (tolérance au glufosinate et caractère de modification de la teneur et composition en lignine) n'est pas de nature à affecter la persistance des plantes dans l'environnement. Des variétés expérimentales exploitant la mutation *bm3*, dont le phénotype porte sur la teneur et la composition en lignine, caractère qualitativement identique à celui conféré par la construction génétique introduite dans les plantes transgéniques ont été cultivées. Aucune modification du cycle végétatif et reproductif n'a été observée en serre ou en champ sur les plantes de ces variétés. On peut supposer que les plantes génétiquement modifiées ne se comporteront pas différemment que des mutants *bm3*, donc ne seront pas plus persistantes que des maïs conventionnels en habitat agricole.

Il n'y aura pas de pulvérisation de glufosinate sur ces plantes. Il ne sera appliqué éventuellement que sur des petites surfaces de feuille dans le but de repérer les plantes porteuses de la modification génétique.

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 peu probable étant donné les précautions prises (castration, ensachage des panicules ou établissement d'une distance d'isolement) et l'absence d'espèces apparentées. 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 improbables. Combiné à l'absence d'avantage sélectif évident, ce transfert peut être considéré comme un risque très faible.

H.3. Incidences des interactions avec les organismes non-cibles

Les plantes faisant l'objet de ce dossier n'ont pas vocation à agir directement sur des organismes cibles. Aucune interaction n'est prévisible par rapport à ces essais.

Des variétés expérimentales exploitant la mutation *bm3*, dont le phénotype porte sur la teneur et la composition en lignine, caractère qualitativement identique à celui conféré par la construction génétique introduite dans les plantes transgéniques ont été cultivées. Aucune différence de comportement de ces plantes dans leur interaction avec l'environnement n'a été relevée (modification de l'interaction avec des insectes, des pucerons ou des pathogènes fongiques, appétence, ...).

On peut donc supposer que les plantes transgéniques à teneur modifiée en lignine ne présenteront pas de modification d'interactions avec les organismes non-cibles. L'incidence écologique de ces essais peut être considérée comme minime.