

EXPERIMENTATION AU CHAMP

SOJA

DOSSIER N° B/FR/ 02-03-07

**SOJA TRANSGENIQUE
TOLERANT AU GLYPHOSATE ET A L'ISOXAFLUTOLE.**

Essais à finalité de recherche.

Projet pluri-annuel de 2 ans (2002 à 2003)

FEVRIER 2002

SOMMAIRE

A. INFORMATIONS D'ORDRE GENERAL	3
B. INFORMATIONS CONCERNANT L'ESPECE VEGETALE RECEPTRICE	5
C. INFORMATION CONCERNANT LA MODIFICATION GÉNÉTIQUE	9
D. INFORMATION CONCERNANT LA PLANTE SUPÉRIEURE GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉE	10
E. INFORMATION CONCERNANT LE SITE DE DISSÉMINATION	14
F. INFORMATIONS CONCERNANT LA DISSÉMINATION	16
G. INFORMATIONS SUR LES PLANS DE SURVEILLANCE, DE CONTROLE, ET DE TRAITEMENT DU SITE ET DES DECHETS APRES DISSEMINATION	17
H. INFORMATION SUR LES EVENTUELLES INCIDENCES DE LA DISSEMINATION DES PLANTES GENETIQUEMENT MODIFIEES SUR L'ENVIRONNEMENT	18

A. INFORMATIONS D'ORDRE GENERAL

1- Nom et adresse du notifiant :

Aventis CropScience France SA
55 Avenue René Cassin
69337 LYON cedex 09
Tel : 04-72-85-43-21

Personne à contacter : En application de la loi de 1978 relative à la protection des informations nominatives cette information est classée confidentielle.

2- Nom et qualification des scientifiques responsables :

Le suivi de l'ensemble des essais sera réalisé sous la tutelle des personnes suivantes :

Responsable Coordination Recherche	Responsable Evaluation France	Responsable Affaires Réglementaires Biotechnologies
Aventis CropScience SA 14-20 rue Pierre Baizet B.P. 9163 69263 LYON CEDEX 09	Aventis CropScience France SA 55 Avenue René Cassin 69337 LYON cedex 09	Aventis CropScience France SA 55 Avenue René Cassin 69337 LYON cedex 09
Global Regulatory Manager	Responsable Evaluation Site 1	Responsable Evaluation Site 2
Aventis CropScience France SA 55 Avenue René Cassin 69337 LYON cedex 09	Station expérimentale Aventis CropScience France 20 rue des Varennes 69380 Chazay d'Azergues	Station expérimentale Aventis CropScience France 14, rue de la Pierre Follège 91660 Méréville

3. Titre du projet :

Titre : Essai à finalité de recherche pluri-annuel de deux ans permettant de déterminer le comportement au champ de différents événements de transformation de Soja dans lesquels on a intégré un caractère de tolérance au glyphosate et un caractère de tolérance à l'isoxaflutole.

Objectif principal :

La construction ou création d'un organisme génétiquement modifié (OGM) puis son développement est un processus long qui se déroule en plusieurs étapes. Ce processus débute tout d'abord dans un laboratoire et comprend des expérimentations en milieu confiné in vitro, ensuite en serre pour déboucher éventuellement sur des expérimentations en milieu ouvert.

L'essai qui fait l'objet du présent dossier entre dans cette logique. Il a pour objectif principal d'étudier des caractères dont l'expression dans les plantes nécessite la culture en plein champ en un seul site, sur de faibles surfaces (quelques centaines de m²). A priori cet essai ne devrait nécessiter qu'une année de mise en culture. La demande est effectuée pour deux ans du fait d'aléas pouvant empêcher une réalisation complète en 2002.

Plusieurs événements de transformation différents sont étudiés. Ces événements sont des OGM différents transformés avec des séquences d'ADN portant les mêmes gènes. L'essai permettra de trier et d'identifier les

événements de transformation les plus intéressants dans le cadre du projet et d'en multiplier les semences. Cette identification ne peut être effectuée qu'en champ, les essais conduits en serre ayant déjà éliminé les événements de transformation sans valeur agronomique. Chaque événement ne sera représenté que par le nombre de plantes nécessaires au traitement statistique des résultats en fonction essentiellement :

- des différents traitements herbicides appliqués
- du nombre de répétitions internes à l'essai.

Le laboratoire travaillant à l'obtention de ces événements de transformation est situé en France. L'identification précoce des meilleurs événements de transformation nécessite un suivi régulier par ceux qui les ont conçus, des prélèvements et éventuellement des études de laboratoire complémentaires. La proximité du site d'expérimentation, et donc son implantation en France, est un des facteurs clés du succès du travail expérimental conduit par ce laboratoire. Le personnel technique compétent peut accéder quotidiennement sur le site expérimental et éventuellement intervenir à tout moment.

La forte sensibilité des plantes de grande culture au glyphosate a limité son utilisation à des applications de pré-émergence dans les stratégies de culture sans travail du sol et comme herbicide ou défanant par application sur grandes cultures avant récolte. Avec le développement des plantes génétiquement modifiées tolérantes au glyphosate, cet herbicide peut maintenant également être utilisé en post-émergence, ce qui permet aux agriculteurs de traiter de façon adaptée après semis.

En culture de soja, l'absence de mauvaises herbes est une exigence. Cet objectif est atteint dans la très grande majorité des cas par l'utilisation d'herbicides. Les binages mécaniques n'interviennent qu'occasionnellement pour résoudre des problèmes ponctuels. Le désherbage consiste actuellement à pulvériser des associations de matières actives en un ou, plus fréquemment, plusieurs passages. L'objectif est de détruire le maximum de mauvaises herbes sans endommager la culture, deux caractéristiques antinomiques. La transformation du soja par génie génétique a permis de concilier ces deux caractéristiques contradictoires : le glyphosate continue à détruire toutes les espèces végétales traitées, donc les mauvaises herbes, à l'exclusion de la plante cultivée qui a acquis la tolérance à l'herbicide.

A titre d'illustration des bénéfices attendus pour la société par le développement des plantes transgéniques tolérantes aux herbicides, nous pouvons citer entre autres les références suivantes :

- ◆ L'étude du CETIOM présentée à la CGB en Octobre 2000 : l'alternative « lutte chimique incluant des plantes tolérantes aux herbicides » pourrait attirer en France prioritairement des agriculteurs représentant 20% à 40% de la surface colza, et concernerait en priorité les parcelles qui reçoivent aujourd'hui des traitements multiples et onéreux (programmes à 2, 3 ou 4 passages), et visant des problèmes spécifiques de flore difficile.
- ◆ Par ailleurs, il a été démontré que l'utilisation de plantes tolérantes aux herbicides a conduit à réduire l'utilisation globale d'herbicide sur les espèces concernées à l'exemple :
 - du colza, avec une réduction des quantités au Canada de 6000 tonnes/an en 1999 et 2000, soit une réduction d'environ 25% depuis 1997. (source : <http://www.canola-council.org/production/final.zip>)
 - du soja, avec une réduction de 16 millions d'applications herbicides entre 1995 et 1998 aux USA, soit une réduction d'environ 10%. (source : National Center for Food and agricultural Policy, 2000; <http://www.ncfap.org/reports/biotech/rsoybeanbenefits.pdf>)

4. Développements ultérieurs envisagés :

A court terme :

En fonction des résultats obtenus sur l'essai, il sera envisagé entre autres :

- de comparer les meilleurs événements de transformation obtenus aux événements de transformations qui seront ultérieurement produits au laboratoire;
- d'affiner, avec des dispositifs expérimentaux analogues, notre connaissance agronomique des meilleurs événements de transformation.

Exemple de développements possibles à moyen terme :

Exemple de développements possibles à moyen terme :

- Etudier les performances agronomiques des meilleurs événements de transformation dans des sites variés et sur plusieurs cycles culturaux, pour fournir des références agronomiques comparatives par rapport à des témoins.
- Produire le matériel génétique, plantes et graines, nécessaire aux études réglementaires liées au développement du meilleur événement de transformation.

B. INFORMATIONS CONCERNANT L'ESPECE VEGETALE RECEPTRICE

1- Position taxinomique

nom de famille :	Leguminosae
genre :	<i>Glycine</i>
espèce :	<i>max</i>
sous espèce :	
cultivar / lignée :	Jack.
nom usuel :	Soja

Le soja est membre de la famille des Leguminosae. C'est l'une des espèces de grandes cultures les plus adaptables et elle peut pousser sous la plupart des latitudes. Le soja est principalement produit aux Etats-Unis, en Argentine, Brésil, Inde et Chine, son pays d'origine.

Malgré la présence de substances antinutritives qui peuvent être réduites par différents procédés, et de substances allergènes, le soja a été utilisé en nutrition humaine depuis 5000 ans. Le soja occupe une position de premier plan parmi les espèces de grandes cultures en étant la plus importante source de concentrés protéiques et d'huile végétale. Le soja a donc un potentiel élevé à résoudre les problèmes nutritionnels. Le soja et ses produits ont un nombre d'applications tellement important que le terme de "plante miracle" est souvent utilisé pour désigner le soja.

2- Reproduction / compatibilité sexuelle

2.1- Information concernant la reproduction

2.1.a- Mode de reproduction

Le soja cultivé est une plante annuelle essentiellement autogame.

Les fleurs parfaites, présentant à la fois un pistil et des étamines, sont formées à la base de l'axe des feuilles. Lors de la floraison, les organes mâles mûrissent avant l'ouverture du bourgeon floral de telle sorte que le pollen est déposé directement sur le stigmate de la même fleur, dans les 24 heures avant l'ouverture complète de la fleur, assurant ainsi un degré important d'autofécondation. Les fécondations croisées représentent moins de 1% des fécondations chez le soja. Les abeilles sont responsables des croisements hétérogames occasionnels.

Les plantes de soja sont issues de lignées homozygotes pratiquement pures. Dans les schémas de sélection, les croisements sont réalisés à la main.

Les soja cultivés ne se reproduisent que par graine. Une plante de soja peut produire jusqu'à 400 gousses, chacune contenant 5 graines. La reproduction végétative du soja n'existe pas en conditions de plein champ.

2.1.b- Facteurs spécifiques affectant la reproduction

Les premières fleurs apparaissent sur des plantes qui ont entre 35 et 50 cm de hauteur, présentant de 7 à 10 entre-nœuds complètement développés. L'apparition des fleurs le long des tiges et des ramifications se poursuit durant toute la durée de croissance végétative de la plante. Par ailleurs la proportion de fleurs et de gousses capables de donner des graines est très sensible aux facteurs environnementaux (stress hydrique, photopériode, sols, etc).

Le soja est une plante de jours courts. La réponse des cultivars de soja à la photopériode est le facteur principal affectant la durée requise de mise à fleur et de maturité :

- Une croissance sous une latitude plus basse que requise se traduit par une floraison accélérée et une réduction à la fois du rendement et de la qualité des graines;
- Une croissance sous une latitude plus élevée que requise se traduit par une phase végétative étendue et un retard dans la floraison et la maturité des graines.

Le nombre de jours nécessaires à la mise à fleur est également dépendant de la température. Entre 10 et 30°C, une augmentation de la température moyenne se traduit par une accélération de la floraison alors qu'une réduction de la température moyenne la retarde.

Des conditions de stress comme des températures élevées ou l'humidité réduisent le rendement (diminution du nombre de gousses et/ou du nombre d'ovules par gousse et/ou du poids des graines).

Les semences de soja ne peuvent également maintenir un pouvoir germinatif élevé et une bonne vigueur que pendant un temps limité. C'est pour cette raison que les semences commerciales de soja sont produites chaque année pour la seule saison culturale suivante.

2.1.c- Temps de génération

Le temps de génération du semis à la récolte en grains peut-être estimé à environ 3 à 5 mois. Dans les conditions européennes, le temps de génération varie de 80 à 200 jours.

2.2- Compatibilité sexuelle avec la flore

Le soja est une espèce qui ne se croise naturellement qu'avec les autres membres du genre *Glycine*, sous-genre soia : *Glycine soia* Sieb. & Zucc., et *Glycine gracilis* Skvortz. Ces dernières sont des espèces annuelles asiatiques.

Il n'existe pas d'espèces végétales cultivées autre que le soja, ou d'espèces sauvages, sexuellement compatibles avec le soja en France.

3- Capacité de survie

3.1- Capacité à former des structures de survie ou de dormance

Les semences de soja ne peuvent maintenir un pouvoir germinatif élevé et une bonne vigueur que pendant un temps limité. Les plantes de soja sont annuelles et les graines ne survivent généralement pas dans l'environnement d'une saison culturale à l'autre.

La détérioration des graines est un processus naturel qui implique des changements cytologiques, physiologiques, biochimiques et physiques au niveau de chaque graine. Ces changements ont été décrits comme progressifs, irréversibles et inexorables chez le soja.

Conditions de récolte : Les conditions météorologiques entre la maturité physiologique et la récolte peuvent modifier la qualité des graines. Comme les graines de soja sont hygroscopiques, leur teneur en humidité est conditionnée par l'humidité de l'environnement. Les tissus internes et externes de la graine se modifient de façon différente pendant l'expansion ou la contraction de la graine ce qui peut se traduire par des fissures ou des plis dans les téguments. Les tissus embryonnaires étant juste sous les téguments, la viabilité de la graine peut ainsi être réduite. A 27 % d'humidité, la respiration est accélérée et les réserves de la graine sont consommées. Des téguments relativement fins peuvent aussi se traduire par des dommages mécaniques pour la graine du fait d'une teneur en lignine faible.

Conditions de stockage : Les premiers facteurs affectant la conservation sont la température, l'humidité et l'historique des semences. A 10% d'humidité, les semences peuvent être conservées pendant un an avec une perte faible de la viabilité. Entre 12 et 12,5% d'humidité, le pouvoir germinatif diminue la première année et est proche de zéro après trois ans. Entre 13 et 14% d'humidité, les semences peuvent être conservées pendant l'hiver mais de sérieuses détériorations sont à prévoir la seconde année de conservation. Il n'est pas possible de conserver des graines de soja au delà de 14% d'humidité. Si les conditions de stockage ne sont pas satisfaisantes, *Aspergillus* et *Penicillium* peuvent être les principales causes de la perte du pouvoir germinatif.

3.2- Facteurs spécifiques affectant la capacité de survie

Le soja est sensible aux conditions d'hypoxie ou de stress hydrique ainsi qu'au gel. Les pratiques agricoles courantes conduisent à la destruction des repousses éventuelles par l'usage de traitements herbicides et de travaux du sol variés dans les rotations culturales.

4- Dissémination

4.1- Forme et étendue de la dissémination

Le soja se dissémine essentiellement par les graines, et le pollen.

Le soja est essentiellement autogame. Les fécondations croisées représentent moins de 1% des fécondations chez le soja. Il n'y a pas d'espèce sauvage compatible avec le soja en France. Les espèces sauvages de soja (*G. gracilis*, et *G. soia*), ainsi que les autres espèces du genre *Glycine* poussent de façon naturelle uniquement en Asie.

La reproduction végétative du soja n'existe pas en conditions de plein champ.

4.2- Facteurs spécifiques affectant la dissémination

La viabilité du pollen émis n'excède pas quelques heures. Les abeilles étaient responsables des croisements hétérogames occasionnels (fréquence inférieure à 1%).

5- Distribution géographique de la plante

Le soja est dépendant de l'homme pour sa dispersion géographique. Le soja est principalement cultivé aux Etats-Unis, en Argentine, Brésil, Chine et en Inde. Ces cinq pays représentent 92% de la production mondiale de soja.

Le soja ne pousse pas à l'état naturel en Europe, cependant il est cultivé dans toute la France. D'après l'AMSOL (<http://www.amsol.fr>, source SCEES du 15-09-2001) les surfaces semées en soja en France en 2001 étaient de 120 000 ha dont 6350 dans la région Rhône-Alpes.

D'après la FAO (site internet <http://apps.fao.org>), la surface française emblavée en soja en 2001 était de 118 000 ha, très voisine de la surface occupée en 1998 mais en augmentation de près de 50% par rapport à la surface cultivée en 2000.

6- Pour les espèces végétales qui ne poussent pas normalement dans les états membres, description de l'habitat naturel de la plante, y compris les informations sur les prédateurs naturels, les parasites, les concurrents et les symbiotes :

Le soja cultivé (*Glycine max*) est originaire d'Asie et il n'existe pas d'espèces sauvages apparentées au même genre en Europe. En France le soja est considéré comme une espèce de grande culture.

Les premières cultures de soja ont pour origine la Chine centrale. La pratique culturale du soja a été établie pendant des siècles avant d'être accentuée sous la dynastie Shang (entre -1700 et -1100). Durant cette période le soja est resté en Chine, mais l'augmentation du commerce et des mouvements de population à la fin de cette dynastie ont étendu la culture au sud-est de l'Asie et au sud de l'Asie centrale. Ces deux régions sont devenues des foyers secondaires d'amélioration du soja entre le premier et le seizième siècle après JC.

Le soja a été introduit aux Etats-Unis en 1765.. La culture, était utilisée pour produire des sauces et des vermicelles. L'utilisation aux Etats Unis de soja comme culture destinée à l'alimentation du bétail date de la fin du XIXème siècle.

La culture européenne du soja a débuté à la fin des années 1870.

Exemple d'espèces végétales concurrentes du soja dans les habitats agricoles français : Il s'agit d'espèces considérées par les agriculteurs comme étant des mauvaises herbes :

Amarante, ambrosie à feuilles d' armoise, chénopode blanc, chardon des champs, liseron des champs, datura stramoine, panic pied de coq, renouée, ravenelle, sétaires , moutarde des champs, mouron des oiseaux, mampourde aux écrouelles.

Maladies du soja en France : à l'exception de la Sclérotiniose (*Sclerotinia sclerotiorum*) qui commence à se développer surtout dans les régions françaises qui cultivent d'autres protéagineux, les maladies du Soja ne posent pas, jusqu'à présent, de problèmes majeurs.

Principaux ravageurs européens du soja : aucun ravageur ne pose de problèmes sérieux. La Mouche grise des semis (*Delia platura*) peut nécessiter une intervention. La Pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) peut aussi s'attaquer au Soja.

Symbiotes : Les racines de soja sont normalement infectées par des bactéries, *Bradyrhizobium* et *Rhizobium*, qui provoquent la formation de structures racinaires particulières, les nodules. Cette association favorise la nutrition azotée de la plante, les bactéries transformant l'azote atmosphérique non assimilable par la plante en forme organique assimilable. La plante assure en échange l'alimentation carbonée des bactéries.

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

Intérêt du soja dans la rotation culturale :

Le soja est une légumineuse et à ce titre permet la fixation azotée utile à la fertilisation des sols. Le soja n'est pas considéré comme une mauvaise herbe des cultures du fait de l'absence de dormance des graines.

Transmission des maladies : le soja, au même titre que d'autres cultures, peut être source de transmission de virus et/ou de maladies qui affectent les végétaux.

Interactions avec les autres formes vivantes pendant la culture : se référer au paragraphe précédent qui reprend la liste des plantes adventices, maladies, ravageurs et symbiotes du soja.

Effets possibles toxiques ou nocifs sur les hommes ou les animaux : Malgré une longue histoire de pratique de la consommation du soja, celui-ci contient naturellement des substances anti-nutritives et des substances allergènes.

Substances anti-nutritionnelles naturelles du soja: il s'agit d'inhibiteurs de protéases (essentiellement l'inhibiteur de Kunitz actif contre la trypsine et l'inhibiteur de Bowman-Birk actif contre la chymotrypsine), de lectines, de phyto-œstrogènes qui contiennent des composés isoflavones à activité oestrogénique ou hypocholestérolémique (ces isoflavones peuvent avoir des effets positifs anti-carcinogènes), de stachyose et de raffinose, d'acide phytique.

Certaines de ces substances peuvent être détruites par les procédés industriels de préparation.

Substances allergéniques naturelles du soja : Comme l'arachide et les noix, l'allergie au soja s'est développée récemment avec son utilisation exponentielle sous forme d'ingrédient alimentaire (lécithine de soja, agents de texture, émulsifiants entre autres) dans les produits industriels de natures très diverses. La lécithine de soja contenue dans la farine serait notamment mise en cause dans de rares cas dans l'asthme professionnel des boulangers. Provoquant des réactions graves, voire mortelles chez les personnes sensibles (responsable de 6% des réactions sévères aux USA), son allergénicité est conférée par plusieurs protéines distinctes. L'hypersensibilité à une de ces protéines suffit à développer une allergie au soja. Les effets allergéniques du soja sont attribués à la fraction globuline des protéines de soja qui représente 85% du total des protéines.

C. INFORMATIONS CONCERNANT LA MODIFICATION GENETIQUE

Une partie des informations relatives à ce chapitre a été fournie sous forme confidentielle aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire chargée de l'évaluation du dossier. Ces informations sont relatives à la propriété intellectuelle et en particulier au savoir-faire de l'entreprise. Leur divulgation est à même de nuire à la position concurrentielle du notifiant.

1. *Description des méthodes utilisées pour la modification génétique :*

La technique de bombardement est utilisée pour introduire la construction génétique.

Les informations complémentaires relatives à ce paragraphe ont été fournies aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire chargée de l'évaluation du dossier mais ne sont pas disponibles ici compte tenu des obligations liées à la protection de la propriété intellectuelle.

2. *Nature et source du vecteur utilisé :*

Trente et un événements de transformation sont concernés par cet essai qui comprendra également des lignées non transgéniques à titre de référence.

Les informations complémentaires relatives à ce paragraphe ont été fournies aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire chargée de l'évaluation du dossier mais ne sont pas disponibles ici compte tenu des obligations liées à la protection de la propriété intellectuelle.

3. *Taille, origine (nom des organismes donneurs) et fonction voulue de chaque fragment constituant de la région envisagée pour le transfert :*

La modification génétique est réalisée par intégration d'un gène qui confère au soja une tolérance accrue au glyphosate et d'un autre gène qui lui confère la tolérance à l'isoxaflutole. Le gène de tolérance à l'isoxaflutole est utilisé comme gène permettant la sélection des plantes en laboratoire. Ces soja génétiquement modifiés ne contiennent pas de gène de résistance aux antibiotiques.

La tolérance des plantes à l'isoxaflutole est conférée par l'insertion du gène modifié de la cible métabolique de l'isoxaflutole originaire de *Pseudomonas fluorescens*. Les séquences promotrices permettant l'expression de ce gène sont originaires de plantes.

La tolérance des plantes au glyphosate est conférée par l'insertion du gène modifié de la cible métabolique du glyphosate originaire du maïs. Les séquences promotrices permettant l'expression de ce gène sont originaires de plantes.

Les informations complémentaires relatives à ce paragraphe ont été fournies aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire chargée de l'évaluation du dossier mais ne sont pas disponibles ici compte tenu des obligations liées à la protection de la propriété intellectuelle.

D. INFORMATIONS CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE :

Une partie des informations relatives à ce chapitre a été fournie sous forme confidentielle aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire chargée de l'évaluation du dossier. Ces informations sont relatives à la propriété intellectuelle et en particulier au savoir-faire de l'entreprise. Leur divulgation est à même de nuire à la position concurrentielle du notifiant.

1. Description des traits et caractéristiques qui ont été introduits ou modifiés :

La modification génétique est réalisée par intégration d'un gène qui confère au soja une tolérance accrue au glyphosate et d'un autre gène qui lui confère la tolérance à l'isoxaflutole. Le gène de tolérance à l'isoxaflutole est utilisé comme gène permettant la sélection des plantes en laboratoire. Ces soja génétiquement modifiés ne contiennent pas de gène de résistance aux antibiotiques.

Les évènements utilisés dans le cadre de nos essais peuvent être en ségrégation (la fécondation faisant intervenir des cellules reproductrices ne possédant pas les gènes de tolérance aux herbicides). De ce fait chaque lot de semences contient des plantes transgéniques de l'évènement et des plantes non transgéniques qui seront détruites par les herbicides appliqués sur les essais.

Les informations complémentaires relatives à ce paragraphe ont été fournies aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire chargée de l'évaluation du dossier mais ne sont pas disponibles ici compte tenu des obligations liées à la protection de la propriété intellectuelle.

2. Informations sur les séquences réellement transférées (insert) ou délétées :

2.1 taille et structure de l'insert et méthodes utilisées pour sa caractérisation, avec indication des parties de vecteur introduites dans la PSGM ou d'ADN étranger auto transporteur restant dans la construction de la plante modifiée

L'insertion du gène de résistance à l'isoxaflutole ou du gène de tolérance au glyphosate est indirectement mise en évidence par sélection des plantes sur isoxaflutole ou glyphosate.

Les informations complémentaires relatives à ce paragraphe ont été fournies aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire chargée de l'évaluation du dossier mais ne sont pas disponibles ici compte tenu des obligations liées à la protection de la propriété intellectuelle.

2.2 en cas de délétion, taille et fonction des régions supprimées :

Aucune délétion n'a été mise en évidence. Les plantes transformées sont identiques dans leur morphologie à celles des soja non transgéniques.

2.3 localisation de l'insert dans les cellules de la plante (intégré au chromosome, aux chloroplastes ou aux mitochondries, ou sous forme non intégrée), et méthodes de sa détermination :

Les séquences d'ADN insérées sont intégrées dans les chromosomes, les séquences d'ADN introduites utilisant des séquences permettant l'expression (promoteurs) que nous savons fonctionnelles dans le noyau des cellules de soja.

Les analyses moléculaires en Southern blot révèlent la présence d'au moins une insertion dans l'ADN chromosomique.

Les informations complémentaires relatives à ce paragraphe ont été fournies aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire chargée de l'évaluation du dossier mais ne sont pas disponibles ici compte tenu des obligations liées à la protection de la propriété intellectuelle.

2.4 nombre de copies de l'insert :

Les analyses moléculaires en Southern blot révèlent la présence d'au moins une insertion dans l'ADN chromosomique.

Les informations complémentaires relatives à ce paragraphe ont été fournies aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire chargée de l'évaluation du dossier mais ne sont pas disponibles ici compte tenu des obligations liées à la protection de la propriété intellectuelle

2.5 Identification précise des lignées de transformation qui font l'objet de la demande d'autorisation :

Trente et un évènements de transformation sont concernés par cet essai qui comprendra également des lignées non transgéniques à titre de référence.

Certains de ces évènements ne seront probablement pas semés en 2002 si la quantité de graines produites en serre pour un évènement donné et pour les essais n'est pas suffisante avant la date de semis.

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

3.1 informations concernant l'expression de l'insert et les méthodes utilisées pour sa caractérisation

Etudes phénotypiques :

Les soja génétiquement modifiés transformés avec le gène de tolérance à l'isoxaflutole et le gène de tolérance au glyphosate sont tolérants à ces herbicides dans nos conditions de serre.

3.2 parties de la plante où l'insert est exprimé (par exemple les racines, la tige, le pollen, etc.) :

Les produits des gènes sont exprimés fortement dans les tissus foliaires et les zones de forte croissance (apex). De par les constructions génétiques utilisées, les protéines correspondant aux gènes insérés ne devraient pas être présentes dans le pollen.

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

4.1 mode et/ou vitesse de reproduction :

Nous n'avons pas relevé de différence de mode et de vitesse de reproduction entre les plantes transgéniques et la plante réceptrice en serre et, dans le cas de certains évènements, en champ.

4.2 dissémination :

Nous n'avons pas relevé de différence de mode de dissémination entre les plantes transgéniques et la plante réceptrice en serre et, dans le cas de certains évènements, en champ. La floraison, le développement des graines et le nombre de graines récoltées ne diffèrent pas de la plante réceptrice dans nos conditions de serre et de champ.

4.3 capacité de survie :

Nous n'avons pas relevé de différence de capacité de survie entre les plantes transgéniques et la plante réceptrice en serre et, dans le cas de certains évènements, en champ. Par ailleurs, les plantes génétiquement modifiées restent sensibles à tous les herbicides autres que les isoxazoles et les herbicides shikimiques, qui agissent sur le soja (exemple : glufosinate ammonium, bromoxynil, 2,4-D..).

5. Stabilité génétique de l'insert :

Les caractères de résistance à l'isoxaflutole ou au glyphosate sont transmissibles ainsi que l'ont montré les sélections successives de plantes en présence d'herbicide. Nous n'avons pas relevé de différences de sensibilité à ces herbicides à ce jour entre les différentes générations de soja transgéniques.

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

La possibilité de transfert du matériel génétique des plantes génétiquement modifiées dans d'autres organismes n'a pas été démontrée à ce jour en dehors des croisements entre soja via le pollen. Le soja est essentiellement autogame. Les fécondations croisées représentent moins de 1% des fécondations chez le soja. Il n'existe pas d'espèce sauvage compatible avec le soja en France. Les espèces sauvages de soja (*G. gracilis* et *G. soia*), ainsi que les autres espèces du genre *Glycine* poussent de façon naturelle uniquement en Asie. Ces caractéristiques biologiques constituent une garantie pour assurer l'absence de dissémination dans l'environnement.

La reproduction végétative du soja n'existe pas en conditions de plein champ.

Il n'a jamais été mis en évidence de transfert ou d'échange génétique entre le soja et des organismes qui ne sont pas sexuellement compatibles avec le soja.

La biologie de la reproduction du soja, l'absence de pression de sélection, la surface limitée de l'essai et son utilisation exclusive à des fins de recherche excluant toute consommation sont des facteurs de diminution, voire d'exclusion de ce risque.

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

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

Plusieurs données permettent de considérer que l'insertion du gène de tolérance au glyphosate a de faibles chances de générer des réactions allergènes chez l'Homme :

- Le maïs n'a pas d'histoire liée à l'allergénicité;
- La protéine présente une très forte homologie de séquence avec son homologue naturel chez le maïs.

Les produits de la récolte (semences) sont destinés à l'expérimentation. Aucun produit n'est destiné à l'alimentation humaine ou animale sous quelque forme que ce soit.

8. Mécanismes d'interaction entre la plante génétiquement modifiée et les organismes cibles (le cas échéant) :

Sans objet. Il n'y a pas d'organisme cible des protéines produites par les gènes insérés.

9. Interactions potentiellement significatives avec les organismes non ciblés :

Aucune différence de sensibilité aux maladies ou aux ravageurs n'a été mise en évidence entre les soja conventionnels et les soja génétiquement modifiés que ce soit en serre ou au champ.

Il n'y a pas de raison connue qui puisse laisser penser que les abeilles peuvent être affectées par l'essai. De par les constructions génétiques utilisées, les protéines correspondant aux gènes insérés ne sont pas attendues dans le pollen.

Les caractères introduits permettent de traiter les plantes de soja au glyphosate ou à l'isoxaflutole sans les détruire. Par contre les mauvaises herbes connues pour leur sensibilité au glyphosate ou à l'isoxaflutole seront éliminées par le traitement herbicide.

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

Méthodes phénotypiques :

Tolérance à des applications d'isoxaflutole ou de glyphosate.

Méthodes moléculaires :

Mise en évidence des protéines hétérologues par analyses de type Western blots

Mise en évidence de la présence des séquences insérées par amplification du (des) gène(s) par PCR et /ou analyses moléculaires par Southern blots .

11. Informations, le cas échéant, sur les précédentes disséminations de la plante génétiquement modifiée :

Trois disséminations analogues à l'essai demandé mais pour des événements de transformation différents ont déjà été réalisées en Espagne sous les numéros de dossier B/ES/ 97/28 et B/ES/98/37 et en France sous l'autorisation B/FR/00-02-08.

Ces essais concernaient d'autres événements de transformations de Soja qui contenaient un gène de tolérance à l'isoxaflutole. Dans ces essais nous avons comparé et évalué la tolérance des plantes à l'isoxaflutole avec des résultats suffisamment significatifs pour permettre la poursuite des programmes de recherche. Cette poursuite s'oriente vers la définition des séquences d'ADN les plus favorables à l'efficacité des transgènes ainsi qu'à l'amélioration de nos techniques de transformation.

Les rapports relatifs à ces essais ont été transmis aux Autorités Compétentes françaises et espagnoles.

D'autres essais ont été conduits en France et en Espagne avec les gènes de tolérance à l'isoxaflutole et/ou au glyphosate sur maïs, colza et tabac avec entre autres :

Espagne	1997, 1998	Maïs, soja
Espagne	1997	Tabac
France	1997, 1998, 1999	Maïs
France	1996, 1997, 1999	Tabac
France	1997	Colza

E. INFORMATION CONCERNANT LE SITE DE DISSÉMINATION:

1. Localisation et étendue des sites de dissémination :

Les plantes génétiquement modifiées objets de cette demande d'expérimentation au champ seront implantées sur un seul site d'essais en 2002. Deux sites localisés dans la vallée de l'Azergues et dans la vallée de la Juine font l'objet du dossier mais l'essai ne sera implanté que sur un seul des deux sites.

Dans nos pratiques d'expérimentation en champ, le soja est semé à raison de 10 à 15 graines par mètre linéaire en retenant une distance de 30 à 60 cm entre chaque rang. Sachant que nous mettrons au plus 5000 plantes transgéniques sur la parcelle, la surface couverte par l'essai n'excédera pas les 500 m².

2. Description des écosystèmes concernés, y compris le climat, la flore et la faune:

Les deux sites de dissémination correspondent à ceux d'une exploitation agricole en ce sens que les parcelles sont soumises tous les ans à des cultures en rotation avec travail mécanique du sol et désherbage. Le site sur lequel sera implanté l'essai ne permet pas de laisser des parcelles en jachère.

Vallée de l'Azergues : Le site est implanté dans la vallée de l'Azergues et ses écosystème, climat et flore correspondent à ceux des vallées fluviales de la région lyonnaise. Le site sur lequel sera implanté l'essai est clos.

Climat : Le climat de la région lyonnaise est semi-continentale. La figure 1 illustre les précipitations et températures observées sur une station d'Aventis CropScience en 2001. Des données analogues ont été recueillies pour les années précédentes. Ces données montrent clairement l'existence de gelées entre les mois de novembre et mars, défavorables au maintien de graines de soja viables d'une année à l'autre sur le site.

Sol : Les sols des parcelles de la station sont de texture limono-sableuse.

Flore : Parmi les espèces adventices présentes sur le site on notera simplement la présence d'*Amaranthus* spp.

Vallée de la Juine : La station est implantée dans la vallée de la Juine et ses écosystème, climat et flore correspondent à ceux des vallées de la région parisienne

Climat : La figure 2 illustre les précipitations et températures observées sur le département entre 1961 et 1990. Ces données montrent clairement l'existence de gelées entre les mois d'octobre et avril, défavorables au maintien de graines de soja viables d'une année à l'autre sur le site.

Sol : Les sols des parcelles de la station sont de texture limono-argileuse

Flore : Espèces adventices présentes : vulpin, véroniques, gaillet, matricaire, stellaire, chénopode, morelle et amarante.

3. Présence d'espèces apparentées sauvages sexuellement compatibles ou d'espèces végétales cultivées sexuellement compatibles :

Absence de soja à proximité. Il n'existe pas d'espèces végétales cultivées autre que le soja ou d'espèces sauvages sexuellement compatibles avec le soja en France.

4. Proximité du site de biotopes officiellement reconnus ou de zone protégée susceptibles d'être affectés :

Il n'y a pas de biotopes officiellement reconnus ou de zone protégée susceptibles d'être affectés à proximité du site d'expérimentation.

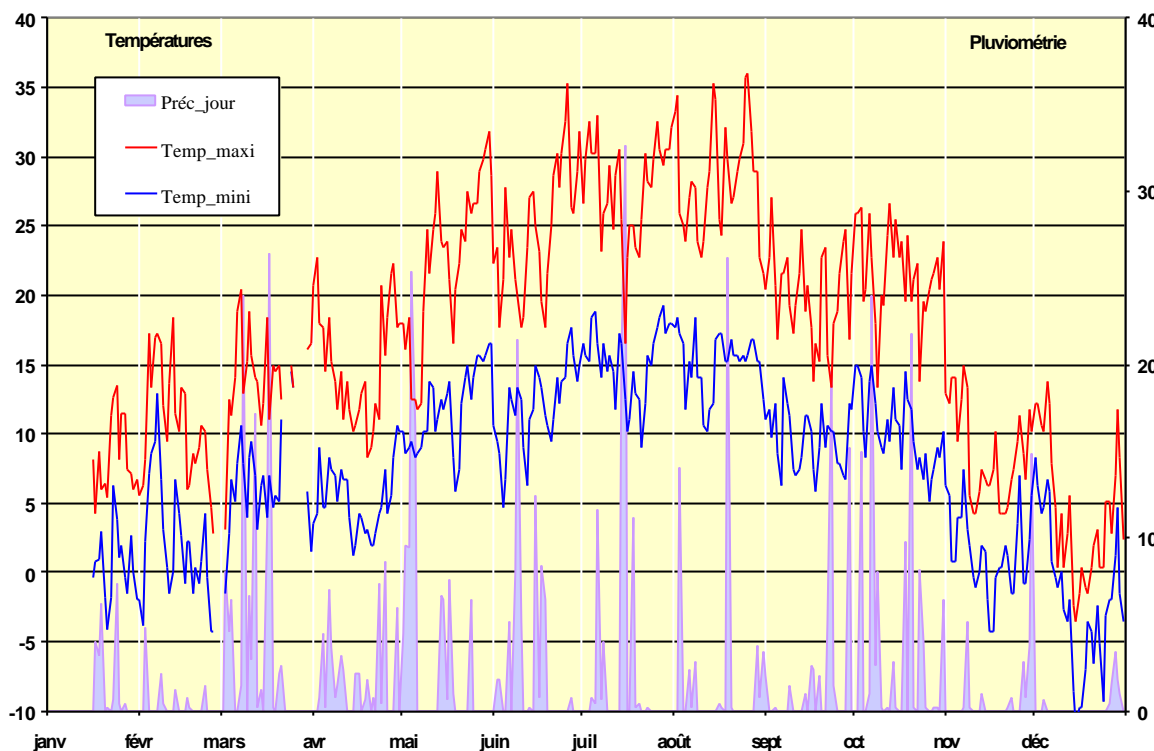


Figure 1 : Relevés météorologiques sur la station expérimentale de Chazay d'Azergues en 2001.

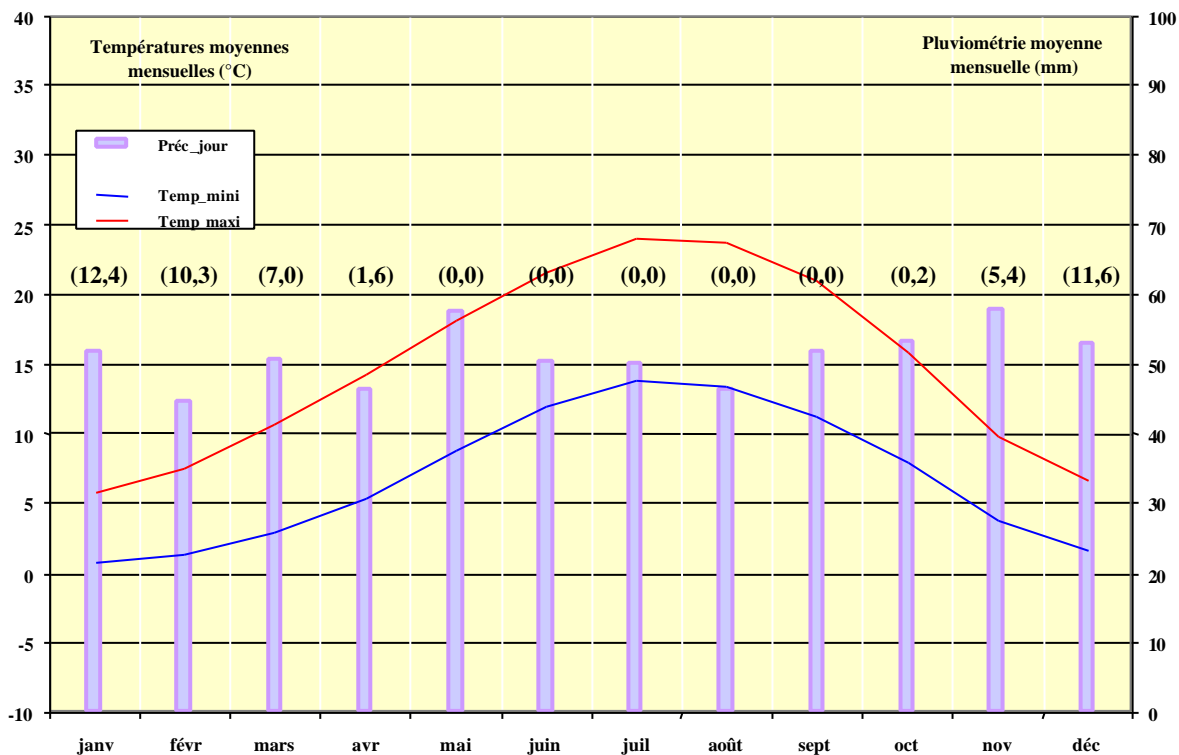


Figure 2 : Relevés météorologiques sur l'Essonne exprimés en moyennes mensuelles sur la période de 1961 à 1990. Les chiffres entre parenthèse représentent le nombre moyen de jours par mois présentant des valeurs de températures minimales inférieures ou égales à 0°C.

F. INFORMATIONS CONCERNANT LA DISSEMINATION :

1. Objectif de la dissémination :

- ▶ Déterminer le comportement au champ de lignées de soja dans lesquelles on a intégré un gène de tolérance au glyphosate et un gène de tolérance à l'isoxaflutole. L'objectif principal de cet essai est d'évaluer ces tolérances sur de nouvelles lignées qui n'ont pas encore été testées en conditions agronomiques en France. L'essai nous permettra donc de vérifier l'aptitude de nos gènes et de nos construits (séquences de régulation) pour la poursuite de nos programmes de recherche et de générer les graines nécessaires aux évaluations ultérieures.
- ▶ Sélectionner les événements de transformation présentant les caractéristiques agronomiques souhaitées
- ▶ Multiplier les semences pour des essais ultérieurs en France ou dans le monde
- ▶ La possibilité offerte aux biologistes du département de biotechnologies de visiter quotidiennement l'essai est un aspect majeur dans le choix du site d'expérimentation.

2 Information concernant les herbicides:

L'isoxaflutole est une matière active herbicide développée par Aventis CropScience et homologuée en Europe. Les spécialités commerciales en France contenant de l'isoxaflutole sont connues sous les noms de Merlin, Emerode, Acajou, Lagon, Atoll et Boréal.

Le glyphosate est utilisé largement comme herbicide à spectre large, c'est un herbicide de contact dit "total". Il est très peu toxique pour l'homme et l'environnement et est autorisé à l'utilisation en France pour des usages de désherbage en zone cultivée ou de débroussaillage.

3. Date et durée prévues de l'opération :

Culture entre avril et novembre, durant 2 ans à partir de 2002. Le semis aura lieu vraisemblablement au début du mois de mai

4. Méthode de dissémination envisagée :

Les soja transgéniques seront implantés par semis direct des graines sur la parcelle.

5. Préparation et gestion du site avant, pendant et après la dissémination, y compris les pratiques culturales et les méthodes de récolte :

Conduite de culture selon la pratique agronomique habituelle pour le soja en tenant compte des normes françaises et des textes de lois relatifs aux essais de plantes transgéniques en plein champ. L'accès du site sera limité au seul personnel autorisé. L'essai sera visité régulièrement pendant la durée de l'essai. Toutes les opérations liées à l'essai seront notées.

Les semences sont conservées dans une enceinte close de la station d'expérimentation d'Aventis CropScience. Les sachets ou conteneurs servant au stockage des graines sont identifiés à l'aide du signe biorisque.

Ces sachets ou conteneurs portent également la mention "organismes génétiquement modifiés" ainsi que les noms des événements contenus dans les paquets.

Les graines seront semées sur une parcelle destinée exclusivement à des expériences agrochimiques.

L'essai sera détruit après récolte des semences par passage au Rotavator et une rotation normale des cultures sera effectuée, utilisant des herbicides totaux différents de l'isoxaflutole et du glyphosate.

Après la fin de l'essai, un contrôle des repousses sera effectué par le personnel compétent de la station agronomique. Les repousses éventuelles seront détruites par application d'un herbicide total différent de l'isoxaflutole et du glyphosate sur l'ensemble de la parcelle.

Il faut également noter que les services de la Protection des Végétaux, dépendant du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, sont en charge du contrôle réglementaire de ces essais dans le cadre de leur mission officielle. Cette mission de contrôle couvre les modalités de réalisation et de suivi de l'expérimentation telles que définies dans l'avis de la Commission du Génie Biomoléculaire relatif à la présente autorisation.

6. Nombre approximatif de plantes (ou plantes par mètre carré) :

Nous envisageons un essai comportant au plus 5000 plantes transgéniques concernant un maximum de 31 évènements de transformation. Les essais comprendront également des lignées conventionnelles non transgéniques. Il est envisagé différents traitements au glyphosate. Nous envisageons au plus 150 plantes par génotype, par répétition et par traitement.

G. INFORMATIONS SUR LES PLANS DE SURVEILLANCE, DE CONTROLE, ET DE TRAITEMENT DU SITE ET DES DECHETS APRES DISSEMINATION :

1. Précautions prises

a) Distance des autres espèces sexuellement compatibles :

Absence de soja à proximité. Il n'existe pas d'espèces végétales cultivées autre que le soja ou d'espèces sauvages sexuellement compatibles avec le soja en France.

Du fait de l'autogamie du soja, les essais sont donc en isolement sans qu'il soit nécessaire d'appliquer une distance minimale vis à vis d'autres semis non expérimentaux de soja.

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

Le soja est essentiellement autogame. Les fécondations croisées représentent moins de 1% des fécondations chez le soja. Une partie de ces fécondations se produira sur la parcelle expérimentale proprement dite, l'ensemble des plantes de soja de l'essai jouant également un rôle de piège à pollen. Le soja est une plante cultivée ne présentant pas de croisement connu avec les espèces sauvages européennes. Par conséquent il n'est pas envisagé de mesure particulière permettant de limiter davantage la dissémination de pollen.

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

L'essai sera détruit par passage au Rotavator et une rotation normale des cultures sera effectuée, utilisant des herbicides totaux différents des isoxazoles et du glyphosate.

Après la fin de l'essai, un contrôle des repousses sera effectué régulièrement par le personnel compétent de la station agronomique. Les repousses éventuelles seront détruites par application d'un herbicide total autre que le glyphosate ou l'isoxaflutole sur l'ensemble de la parcelle.

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

L'essai sera détruit par passage au Rotavator et une rotation normale des cultures sera effectuée, utilisant des herbicides totaux différents des isoxazoles et du glyphosate.

Après la fin de l'essai, un contrôle des repousses sera régulièrement par le personnel compétent de la station agronomique. Les repousses éventuelles seront détruites par application d'un herbicide total autre que le glyphosate ou l'isoxaflutole sur l'ensemble de la parcelle.

4. Description des plans et des techniques de surveillance :

Conduite de culture selon la pratique agronomique habituelle pour le soja. L'accès du site sera limité au seul personnel autorisé. L'essai sera visité régulièrement pendant la durée de l'essai. Toutes les opérations liées à l'essai seront notées.

Les graines seront semées sur une parcelle destinée exclusivement à des expériences agrochimiques. Le personnel est compétent et peut accéder quotidiennement au site expérimental. Il est donc en mesure d'intervenir à tout moment.

L'essai sera détruit après récolte par passage au Rotavator et une rotation normale des cultures sera effectuée, utilisant des herbicides totaux différents de l'isoxaflutole et du glyphosate.

Après la fin de l'essai, un contrôle des repousses sera effectué régulièrement par le personnel compétent de la station agronomique. Les repousses éventuelles seront détruites par application d'un herbicide total autre que le glyphosate ou l'isoxaflutole sur l'ensemble de la parcelle.

5. Description des plans d'urgence :

Destruction de l'essai au Rotavator. Le responsable des affaires réglementaires a autorité pour déclencher la destruction de l'essai.

H. INFORMATIONS SUR LES EVENTUELLES INCIDENCES DE LA DISSEMINATION DES PLANTES GENETIQUEMENT MODIFIEES SUR L'ENVIRONNEMENT :

1. Probabilité des PSGM à devenir plus persistantes que les plantes parentales ou réceptrices dans les habitats agricoles ou à se propager plus rapidement dans les habitats naturels :

La morphologie des plantes génétiquement modifiées ainsi que leur cycle et leur mode de reproduction sont identiques au soja non transgénique. Leur seul avantage est la tolérance à l'isoxazole et au glyphosate qui ne peut s'exprimer que dans un contexte agricole utilisant ces herbicides. La pratique agricole, les conditions climatiques hivernales, les rotations culturales et l'usage d'autres herbicides totaux rendent improbable une persistance accrue et non contrôlée des plantes génétiquement modifiées.

Un contrôle régulier des parcelles et la destruction programmée des repousses éliminent également cette probabilité.

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 :

La morphologie des plantes génétiquement modifiées ainsi que leur cycle et leur mode de reproduction sont identiques à ceux du soja non transgénique. Leur seul avantage est la tolérance à l'isoxazole et au glyphosate qui ne peut s'exprimer que dans un contexte agricole utilisant ces herbicides. La pratique agricole, les conditions climatiques hivernales, les rotations culturales et l'usage d'autres herbicides totaux rendent improbable une persistance accrue et non contrôlée des plantes génétiquement modifiées.

Il n'existe pas d'espèce végétale sauvage sexuellement compatible avec le soja en France.

3. Incidence écologique éventuelle de l'interaction entre la plante génétiquement modifiée et les organismes cibles :

Sans objet. Il n'y a pas d'organisme cible des protéines produites par les gènes insérés.

4. Incidence écologique éventuelle d'interactions possibles avec les organismes non ciblés :

Aucune différence de sensibilité aux maladies ou aux ravageurs n'a été mise en évidence entre les soja conventionnels et les soja génétiquement modifiés que ce soit en serre ou au champ.

Il n'y a pas de raison connue qui puisse laisser penser que les abeilles peuvent être affectées par l'essai. De par les constructions génétiques utilisées, les protéines correspondantes aux gènes insérés ne devraient pas être présentes dans le pollen.

Les caractères introduits permettent de traiter les plantes de soja au glyphosate ou à l'isoxaflutole sans les détruire. Par contre les mauvaises herbes connues pour leur sensibilité au glyphosate ou à l'isoxaflutole seront éliminées par un traitement avec ces herbicides.