

## **SOCIETE BIOGEMMA**

Demande d'autorisation auprès du Ministère de l'Agriculture, de  
l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales

**Essais au champ pluriannuels et multilocaux de  
lignées de maïs génétiquement modifiées en vue de  
l'étude de biosynthèse de la lignine**

**Dossier B/FR/04.03.01**

BIOGEMMA  
5, rue Saint-Germain l'Auxerrois  
75001 PARIS  
Février 2004

---

## **PREAMBULE**

Cette demande d'expérimentation est déposée dans le cadre de la réglementation européenne décrite dans la directive 90/220/CEE, transposée en droit français par la loi du 13 juillet 1992. Cette directive a été modifiée le 17 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 au champ en France pour ces événements de transformation ; il fait suite à différentes expérimentations en serre.

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

<b>Préambule</b>	<b>2</b>
<b>Introduction</b>	<b>7</b>
<b>A. Informations d'ordre général</b>	<b>12</b>
A.1 Nom et adresse du notifiant	12
A.2 Qualification et expérience des scientifiques responsables	12
A.3. Titre du projet	12
<b>B. Informations concernant les plantes réceptrices</b>	<b>13</b>
B.1 Nom complet	13
B.2 Information concernant la reproduction	13
B.3 Capacité de survie	14
B.4 Dissémination	14
B.5 Distribution géographique de la plante	14
B.6 Description de l'habitat naturel de la plante (espèces ne poussant pas habituellement en UE)	15
B.7 Autres interactions potentielles avec des organismes dans l'écosystème habituel	15
<b>C. Informations concernant la modification génétique</b>	<b>15</b>
C.1 Description des méthodes utilisées pour la modification génétique	15
C.2 Nature et source du vecteur utilisé	16
C.3 Taille, origine des organismes donneurs et fonction recherchée de chaque fragment constitutif de la région envisagée pour l'insertion	16
<b>D. Information concernant la plante supérieure génétiquement modifiée</b>	<b>16</b>
D.1 Description du ou des caractères ou des caractéristiques qui ont été introduits ou modifiés	16
D.2 Informations sur les séquences réellement insérées ou délétées	17
D.3 Informations concernant l'expression de l'insert	17
D.4 Description des différences entre la plante génétiquement modifiée et la plante réceptrice	17
D.5 Stabilité génétique de l'insert et stabilité phénotypique de la plante modifiée	18
D.6 Modifications de la capacité de la plante modifiée à transférer du matériel génétique dans d'autres organismes	18
D.7 Information concernant les effets toxiques, allergisants ou autres effets nocifs résultants de la modification génétique sur la santé humaine	18
D.8 Information concernant la sécurité de la plante modifiée pour la santé des animaux, lorsque la plante est destinée à être utilisée dans l'alimentation des animaux	19
D.9 Mécanisme d'interaction entre la plante modifiée et les organismes cibles	19
D.10 Modifications potentielles des interactions de la plante modifiée avec les organismes non-cibles résultant de la modification génétique	20
D.11 Interactions potentielles avec l'environnement abiotique	20
D.12 Description des méthodes de détection et d'identification de la plante	

supérieure génétiquement modifiée	20
D.13 Informations, le cas échéant, sur les précédentes disséminations de la plante génétiquement modifiée	20
<b>E. Informations concernant le site de dissémination</b>	<b>20</b>
E.1 Localisation et étendue des sites de dissémination	20
E.2 Description de l'écosystème des sites de dissémination	21
E.3 Présence d'espèces apparentées sauvages sexuellement compatibles ou d'espèces végétales cultivées sexuellement compatibles	21
E.4 Proximité des sites de biotopes officiellement reconnus ou de zones protégées susceptibles d'être affectées	21
<b>F. Information concernant la dissémination</b>	<b>21</b>
F.1 Objectif de la dissémination	21
F.2 Date et durée prévues de l'opération	22
F.3 Méthode de dissémination envisagée	22
F.4 Méthode de préparation et gestion du site avant, pendant et après la dissémination, y compris les pratiques culturales et méthodes de récolte	23
F.5 Nombre approximatif de plantes	23
<b>G. Information sur les plans de surveillance, de contrôle et de traitement du site et des déchets après dissémination</b>	<b>23</b>
G.1 Précautions prises	23
G.2 Description des méthodes de traitement du site après dissémination	24
G.3 Description des méthodes de traitement après dissémination pour le matériel issu de plantes génétiquement modifiées, y compris les déchets	24
G.4 Description des plans et des techniques de surveillance	24
G.5 Description des plans d'urgence	24
G.6 Méthodes et procédures de protection du site	25
<b>Annexe II D.2</b>	<b>26</b>
Conclusions concernant les incidences potentielles sur l'environnement de la dissémination	26
1. Probabilité que les plantes modifiées deviennent plus persistantes que les plantes parentales ou réceptrices dans les habitats agricoles ou se propagent plus rapidement dans les habitats naturels	26
2. Avantages ou inconvénients sélectifs conférés aux plantes modifiées	26
3. Possibilité de transfert de gènes aux mêmes espèces ou à d'autres espèces végétales sexuellement compatibles dans les conditions de plantation des plantes modifiées et avantages ou inconvénients sélectifs conférés à ces espèces végétales	27
4. Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les plantes modifiées et les organismes cibles, tels que prédateurs, parasitoïdes et agents pathogènes peuvent avoir sur l'environnement	27
5. Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les plantes modifiées et des organismes non-cibles, notamment les incidences sur les niveaux de population des concurrents, herbivores, symbiotes, parasites et agents pathogènes	28

6. Effets immédiats et/ou différés éventuels sur la santé humaine résultant des interactions directes ou indirectes potentielles entre les plantes modifiées et les personnes travaillant ou entrant en contact avec la ou les plantes modifiées disséminées ou se trouvant à proximité 28
7. Effets immédiats et/ou différés éventuels sur la santé des animaux et conséquences pour la chaîne alimentaire résultant de la consommation de la plante modifiée ou de tout produit dérivé s'il est destiné à être utilisé en tant qu'aliment pour animaux 29
8. Incidences immédiates et/ou différées sur les processus biogéochimiques résultant des interactions directes et indirectes potentielles de la plante modifiée et des organismes cibles et non-cibles à proximité du ou des OGM disséminés 29
9. Incidences immédiates et/ou différées, directes ou indirectes, que les techniques spécifiques de culture, de gestion et de récolte utilisées pour les plantes modifiées peuvent avoir sur l'environnement lorsqu'elles sont différentes de celles utilisées pour des plantes supérieures non génétiquement modifiées 29

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

Les expérimentations au champ seront conduites 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.

Par conséquent, une des voies privilégiées 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 500 g/jour par rapport à une variété moins digestible. Ainsi, plus la variété est digestible 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 500 g/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 qui 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 au 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 de la voie de biosynthèse des lignines apparaît être une solution possible 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 lignine 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 de la lignine et la complexité de la voie de biosynthèse ralentissent la compréhension de sa structure et de sa 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.

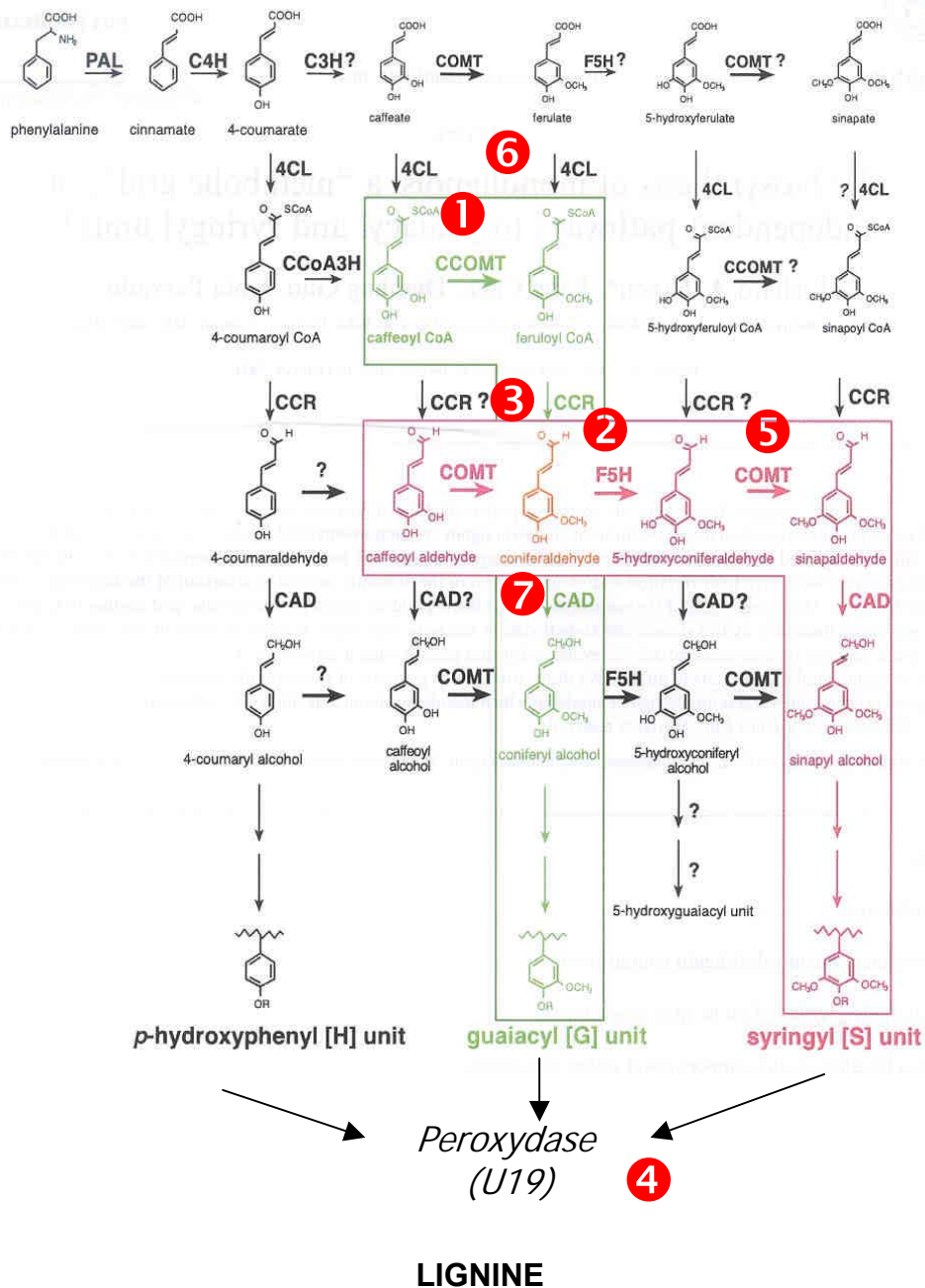


Figure 1 : La voie de biosynthèse de la lignine.

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-hydroxyconiféryl 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 et 3CL),
- une férulate 5-hydroxylase (F5H) à cytochrome P450,
- plusieurs isoformes de cinnamoyl CoA réductase (CCR) et de cinnamyl alcool déshydrogenase (CAD).

Chez le maïs, cette voie utilise également comme précurseur la tyrosine qui est transformée en acide cinnamique par la tyrosine-ammoniac-lyase.

En plus des enzymes impliquées dans la synthèse des monomères de lignine, deux classes de gènes appartenant à des familles multigéniques, les peroxydases et les laccases, sont reportées pour leur rôle putatif dans la polymérisation des monomères de lignine (= sous unités H, G, S).

Dans le cadre de ce dossier, nous souhaitons étudier l'impact de cinq gènes différents impliqués dans la synthèse ou la polymérisation de la lignine (cf. figure 1, page précédente) sur la structure, la composition et la digestibilité des parois. Nous avons produit des plantes transgéniques dans lesquelles nous avons modifié indépendamment l'expression des gènes suivants :

- une cafféoyl-CoA-O-méthyltransférase (étape 1, figure 1),
- une férulate 5 hydroxylase (étape 2),
- une cinnamoyl-CoA réductase (étape 3),
- une peroxydase (étape 4),
- une caffeic acid O-méthyltransférase (étape 5).

La fonction précise de ces gènes 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, des plantes de maïs transgéniques dans lesquelles l'expression d'un de ces gènes est réduite (par introduction d'une séquence antisens ou par RNAi) ou augmentée (par expression de la partie codante du gène sous le contrôle d'un promoteur constitutif) seront cultivées en conditions agronomiques. Nous analyserons ensuite les répercussions de cette modification sur la composition et la teneur en lignine ainsi que sur sa digestibilité *in vitro*.

Cette approche de validation en génomique fonctionnelle a pour but d'assigner une fonction à cinq gènes de la voie de biosynthèse des lignines afin de mieux connaître leur rôle d'un point de vue fondamental et éventuellement d'envisager leur utilisation future pour la création de variétés de maïs de digestibilité accrue.

L'accumulation de lignine est un processus qui s'établit tout au long du développement de la plante et n'est pas identique dans tous les tissus d'une même plante. Il est ainsi important d'appréhender les spécificités tissulaires et temporelles de la lignification liées aux caractéristiques des promoteurs des gènes impliqués dans cette biosynthèse.

Parallèlement à l'étude des gènes qui sont listés ci-dessus, nous avons produit des plantes dans lesquelles ont été introduits des gènes chimériques associant le promoteur du gène étudié au gène rapporteur  $\beta$ -glucuronidase (*gus*). Ceci a été réalisé pour les étapes 1, 2, 3, 6 et 7. Les analyses de ces plantes permettront de

décrire le profil spatio-temporel défini par le promoteur c'est à dire le profil d'expression tissulaire aux différents stades de développement de la plante. Ces expériences sont conduites dans les mêmes conditions de culture que pour l'étude des gènes eux-mêmes fin de corrélés des résultats d'activité enzymatique des protéines codées par les gènes aux profils d'expression des promoteurs. Cette étude est prévue sur six promoteurs différents, tous associés au gène rapporteur *gus*.

## A. INFORMATIONS D'ORDRE GENERAL

### 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 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 au champ pluriannuels et multilocaux de lignées de maïs génétiquement modifiés en vue de l'étude de biosynthèse de la lignine.**

La présente demande concerne la mise au champ de lignées expérimentales de maïs porteuses d'événements de transformation qui modifient, indépendamment, le niveau d'expression de cinq gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des lignines ainsi que de plantes exprimant le gène rapporteur *gus* et destinées à l'étude du profil d'expression de six promoteurs de gènes différents, tous impliqués dans la biosynthèse de la lignine.

Il s'agit de valider le rôle de ces gènes, pour lesquels des informations et résultats concordent pour faire supposer qu'ils interviennent 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. INFORMATION CONCERNANT LES PLANTES RECEPTRICES

### B.1. Position taxonomique

<u>Nom de famille</u> :	<i>Zea mays ssp. mays</i>
<u>Genre</u> :	Graminae
<u>Espèce</u> :	<i>Zea</i>
<u>Sous-espèce</u> :	<i>mays</i>
<u>Lignée</u> :	<i>mays</i>
<u>Nom usuel</u> :	A188
	maïs

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

### B.2. Informations concernant la reproduction

#### 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,
- Nord de la Loire (Centre, Ile-de-France, Picardie, Champagne-Ardenne).

### **B.6. Description de l'habitat naturel de la plante (espèce ne poussant pas naturellement en UE)**

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<sup>ème</sup> 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. Autres interactions potentielles avec des organismes dans l'écosystème habituel**

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. INFORMATIONS CONCERNANT LA MODIFICATION GENETIQUE**

### **C.1. Description des méthodes utilisées pour la modification génétique**

Les plantes de maïs faisant l'objet de ce dossier ont été obtenues, selon les événements de transformation, à l'aide de deux techniques : transformation par *Agrobacterium tumefaciens* ou par biolistique.

La transformation par *Agrobacterium tumefaciens* est basée sur les propriétés naturelles de cette bactérie du sol et sur l'utilisation de vecteurs « désarmés ». Des embryons immatures d'une lignée de maïs sont mis en co-culture *in vitro* avec les cellules d'*Agrobacterium*, puis, après quelques jours, les embryons sont transférés et cultivés sur un milieu de sélection contenant un herbicide (glufosinate ou phosphinothricine). Les cals qui se développent alors sont constitués de cellules transformées. Des plantules sont alors obtenues, acclimatées en chambre de culture puis en serre, et les plantes sont pollinisées. La descendance de ces transformants sera utilisée pour l'expérimentation proposée dans ce dossier.

La transformation par biolistique permet l'introduction directe de gènes dans le végétal ; les vecteurs portant les gènes à transférer ont été introduits dans des cals de maïs qui sont ensuite sélectionnés sur un milieu contenant un herbicide (glufosinate). Des plantes transgéniques sont ensuite régénérées à partir de ces cals.

### **C.2. Nature et source du vecteur utilisé**

Le vecteur utilisé pour la transformation du maïs par *Agrobacterium tumefaciens* est un plasmide appelé vecteur binaire. Dans le cas de la transformation par biolistique, il s'agit de dérivés de pUC.

### **C.3. Taille, origine des organismes donneurs et fonction recherchée de chaque fragment constitutif de la région envisagée pour l'insertion**

Dix-huit constructions génétiques différentes ont été utilisées. Dans le cas de la transformation *via Agrobacterium*, chacune est constituée d'un gène marqueur transférant une résistance à un herbicide et d'une séquence sens, antisens ou RNAi d'un des cinq gènes de la voie de biosynthèse des lignines. Dans le cas de la transformation par biolistique, le gène de sélection et le gène d'intérêt sont portés par deux vecteurs différents.

Ces séquences modifieront partiellement le fonctionnement des cinq gènes du maïs étudiés dans ce projet ou permettront d'exprimer un gène rapporteur (gène *gus*) afin de déterminer le profil spatio-temporel d'expression de six gènes du maïs impliqués dans la biosynthèse de la lignine

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. INFORMATION CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE**

### **D.1. Description du ou des caractères ou des caractéristiques qui ont été introduits ou modifiés**

Les plantes de maïs faisant l'objet de cette demande d'essais au champ sont de deux types :

- certaines présentent une teneur et une composition en lignine modifiées et sont résistantes au glufosinate ammonium (produit herbicide utilisé pour sélectionner les plantules transformées lors des étapes de régénération en culture *in vitro*),
- d'autres expriment un gène rapporteur, le gène *gus*, et sont destinées à l'étude du profil d'expression défini par six promoteurs de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la lignine. Elles sont également 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 insérées ou délétées**

Les séquences réellement transférées ont été recherchées par analyse Southern sur des plantes de première et de seconde génération. 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 de différents phénotypes associés à la réduction de la teneur en lignine.

L'observation des plantes transformées en serre a permis de mettre en évidence différents phénotypes associés au port de la plante (feuilles retombantes ou enroulées). De tels phénotypes sont connus pour d'autres mutants naturels de la voie de biosynthèse de la lignine. La coloration des nervures et de tiges, le port retombant des feuilles, le diamètre réduit des tiges, etc. sont fréquemment associés à une modification de la teneur et/ou composition en lignine.

Dans le cas des plantes exprimant le gène *gus* sous le contrôle de différents promoteurs, l'expression du gène rapporteur a été mise en évidence par des colorations histologique sur plantes de première ou de seconde génération.

### **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 de l'insert et stabilité phénotypique de la plante modifiée**

Les analyses moléculaires et génétiques des transformants primaires, et/ou de leur descendance, 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. Modifications de la capacité de la plante modifiée à transférer du matériel génétique 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, à l'exception, très rare, de plantes des genres *Tripsacum* et *Teosinte* qui pourraient être cultivées comme spécimens botaniques.

Dans le cas particulier des événements faisant l'objet de cette demande, l'émission de pollen par les plantes transgéniques sera limitée par la castration des panicules. La présence de bordures de plantes non-transgéniques qui constitueront un piège à pollen complètera le dispositif de limitation des flux de pollen.

#### **D.7. Information concernant les effets toxiques, allergisants ou autres effets nocifs résultants de la modification génétique sur la santé humaine**

La modification génétique confère aux plantes transgéniques la résistance au glufosinate (herbicides Basta<sup>®</sup> et Liberty<sup>®</sup>) 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<sup>®</sup>), 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 des événements de transformation faisant l'objet de ce dossier 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* par exemple).

L'expression du gène *gus*, avec un profil d'expression spatio-temporel dépendant du promoteur étudié ne semble pas devoir présenter d'effet nocif. Ce gène est naturellement produit par *Escherichia coli*, bactérie présente dans le tube digestif de l'Homme et de nombreux animaux.

Les 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. Information concernant la sécurité de la plante modifiée pour la santé des animaux, lorsque la plante est destinée à être utilisée dans l'alimentation des animaux**

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

La modification d'expression (inhibition et dans quelques cas sur-expression) de l'expression d'un gène de la voie de biosynthèse de la lignine 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'expression du gène *gus* ne semble pas devoir présenter d'effet nocif. Ce gène est naturellement produit par *Escherichia coli*, bactérie présente dans le tube digestif de nombreux animaux.

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 Mécanismes d'interaction entre la plante modifiée et les organismes cibles**

Non applicable.

### **D.10 Modifications potentielles des interactions de la plante modifiée avec les organismes non cible résultant de la modification génétique**

Aucune interaction particulière n'est attendue avec des organismes non cibles. La protéine phosphinothricine acétyltransférase n'est pas connue pour présenter de toxicité. La réduction et dans quelques cas, la sur-expression, de l'expression des protéines impliquées dans la biosynthèse de la lignine ne semble pas devoir modifier ces éventuelles interactions.

L'expression du gène *gus* ne semble pas de nature à entraîner de modification d'interactions avec des organismes non-cibles.

### **D.11 Interactions potentielles avec l'environnement abiotique**

Aucune interaction de cet ordre est envisagée.

### **D.12 Description des méthodes de détection et d'identification de la plante supérieure génétiquement modifiée**

Les plantes transgéniques retenues pour cet essai sont facilement identifiables par leur phénotype de tolérance au glufosinate (tolérance aux herbicides Basta<sup>®</sup> et Liberty<sup>®</sup>).

Des techniques moléculaires peuvent également être utilisées telles que la technique de Southern blotting ou l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) sur les séquences introduites. Ces dernières permettent alors une identification fiable des plantes de maïs transgéniques faisant l'objet de ce dossier.

### **D.13 Informations, le cas échéant, sur les précédentes disséminations de la plante génétiquement modifiées**

Les événements de transformation faisant l'objet de cette demande d'essais en champ n'ont jamais fait l'objet de dissémination.

## **E. INFORMATION CONCERNANT LE SITE DE DISSEMINATION**

### **E.1. Localisation et étendue des sites de dissémination**

Les sites de dissémination pour l'année 2004 se situent en région Midi-Pyrénées, Aquitaine et/ou 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 2 500 m<sup>2</sup>, avec une surface d'environ 1 500 m<sup>2</sup> couverte par les plantes transgéniques.

## **E.2. Description de l'écosystème des sites de dissémination**

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 ne seront pas nécessairement isolées car les panicules des plantes transgéniques seront castrées.

Par ailleurs, des bordures agronomiques de maïs non transgéniques seront implantées autour des parcelles et pourront être éventuellement utilisées comme pollinisateur. Elles serviront également de piège à pollen en cas d'émission accidentelle de pollen.

## **E.3. Présence d'espèces apparentées sauvages sexuellement compatibles ou d'espèces végétales cultivées 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 prises par la castration des panicules, et la présence de bordures de maïs non-transgénique autour de l'essai permettront d'éviter toute dissémination de gènes *via* le pollen à partir des plantes transgéniques en culture.

## **E.4. Proximité des sites de biotopes officiellement reconnus ou de zones protégées susceptibles d'être affectées**

Il n'y a pas de biotope officiellement reconnu ou de zone protégée à proximité des essais. Les informations sur ces sites ont été contrôlées auprès des DIREN.

# **F. INFORMATION CONCERNANT LA DISSEMINATION**

## **F.1. Objectif de la dissémination**

L'objectif général concerne la validation de la fonction de cinq gènes impliqués dans la voie de biosynthèse ou l'assemblage des sous-unités de la lignine, polymère qui s'accumule dans les parois végétales, les rendant très partiellement et difficilement digestibles par les animaux. Il vise à mieux comprendre le processus de biosynthèse et d'accumulation de la lignine par l'étude des profils d'expression dirigés par les promoteurs de six gènes.

Une première série de plantes transformées qui seront évaluées présentent, lorsqu'elles sont cultivées en serre, une teneur et une composition en lignine modifiées. La production en conditions agronomiques a pour but de confirmer ces résultats dans des conditions naturelles de culture. Une seconde série, expriment le gène *gus* dans différents tissus de la plante et avec une intensité différente au cours du développement de celle-ci.

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 préliminaires sur le caractère étudié. Dans le cas de l'accumulation de la 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 phénomène 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 processus 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 2004 ont comme objectifs :

- de produire, sur des surfaces réduites, des plantes qui seront analysées (teneurs en lignines, composition et structure) ; leur digestibilité sera évaluée *in vitro* 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 permettra ensuite de faire des analyses fiables sur un matériel biologique de structure génétique (hybride F1 avec hétérosis) comparable à celle des variétés cultivées pour les productions d'ensilage,
- d'étudier le profil d'expression spatio-temporel du gène *gus* placé sous le contrôle de six promoteurs différents de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la lignine.

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

### **F.2.Date et durée de l'opération**

Pour 2004, les essais sont prévus d'avril à novembre 2004.

Les autres campagnes se dérouleront d'avril à novembre 2005, 2006 et 2007.

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

### **F.3.Méthode de dissémination envisagée**

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

#### **F.4. Méthode de préparation et gestion du site avant, pendant et après la dissémination, y compris les pratiques culturales et méthodes de récolte**

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 rapatriés au laboratoire où le matériel végétal et les 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 15 000 environ sur chaque lieu d'essai.

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

#### **G.1. Précautions prises**

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

Les plantes transgéniques de l'essai seront castrées. Leur pollinisation sera assurée par des lignées de maïs non-transgénique. Aucune distance d'isolement ne sera appliquée.

4 rangs de bordures agronomiques non transgéniques seront 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 visant à minimiser ou à empêcher la dissémination de tout organe reproducteur de la plante génétiquement modifiée**

Le risque de dissémination de pollen transgénique est très fortement réduit puisque les plantes transgéniques cultivées dans cet essai seront castrées. La dissémination de pollen sera ainsi minimisée. De plus la présence de 4 rangs de

bordure agronomique, constituée de plantes de même précocité que les plantes transgéniques, servira de piège à pollen en cas d'émission accidentelle par les plantes transgéniques. 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 les déchets**

Le produit des récoltes (graines, maïs fourrage) sera 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 (campagnes 2005, 2006 et 2007).

## **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, ...). 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.

## **G.6. Méthodes et procédures de protection du site**

Aucune méthode et/ou procédure particulière de protection du site ne sera appliquée.

## ANNEXE II D.2

### CONCLUSIONS CONCERNANT LES INCIDENCES POTENTIELLES SUR L'ENVIRONNEMENT DE LA DISSEMINATION

#### 1. Probabilité que les plantes modifiées deviennent plus persistantes que les plantes parentales ou réceptrices dans les habitats agricoles ou se propagent plus rapidement dans les habitats naturels

Les plantes qui seront cultivées au champ sont de 3 types :

- des plantes dont la composition en lignine sera modifiée par inhibition (ou pour quelques plantes par augmentation) de la synthèse des protéines codées par cinq gènes différents de la voie de biosynthèse de la lignine,
- des plantes exprimant le gène *gus* sous le contrôle de six promoteurs différents de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la lignine.

Ces deux types de plantes seront aussi résistants à la phosphinothricine, matière active des herbicides Basta® et Liberty®.

Un troisième type de plantes sera constitué par des plantes non modifiées, présentant une composition normale de lignine, ou n'exprimant pas le gène *gus*, par ségrégation mendélienne dans la descendance des événements de transformation hémizygotes ou de plantes de lignées non-transgéniques qui serviront de référence pour les analyses de composition de la lignine.

L'herbicide utilisé pour le repérage et/ou la sélection des plantes transformées en serre ou au champ : phosphinothricine ou glufosinate, herbicide total n'est pas homologué en Europe pour des applications sur les cultures commerciales de céréales. Il ne sera appliqué éventuellement lors des essais que par "mouillage de la feuille", sur quelques cm<sup>2</sup> de chaque plante ou par pulvérisation dirigée, dans le but de repérer les plantes porteuses de la ou des modifications génétiques. En l'absence d'utilisation de cet herbicide et donc en l'absence de pression de sélection, il est hautement improbable que les maïs faisant l'objet de cet essai deviennent plus persistants dans les habitats agricoles ou naturels.

#### 2. Avantages ou inconvénients sélectifs conférés aux plantes modifiées

Deux des trois caractères décrits ci-dessous sont présents dans chacune des plantes de maïs transgéniques qui font l'objet de cette expérimentation :

- la tolérance aux herbicides Basta® et Liberty® (herbicides totaux),
- la modification de la composition de la lignine par inhibition ou augmentation spécifique de l'activité enzymatique de cinq enzymes différentes de sa voie de biosynthèse,
- la présence d'une protéine  $\beta$ -glucuronidase (*gus*).

Aucun avantage ou inconvénient sélectif ne semble devoir être conféré à ces plantes, dans les conditions de l'essai, car aucune pression de sélection ne sera

appliquée. Il n'y aura pas de traitement par l'herbicide Basta® ou Liberty®, si ce n'est par mouillage de la feuille sur quelques cm<sup>2</sup> afin de repérer les plantes transformées. Dans ces conditions de traitement, aucune plante, qu'elle soit sensible ou résistante, n'est détruite et la pression de sélection est quasi-nulle.

La modification de la composition de la lignine ou l'expression du gène *gus* ne sont pas nature à induire de pression de sélection pouvant favoriser ou défavoriser ces plantes.

### **3. Possibilité de transfert de gène aux même espèces ou à d'autres espèces végétales sexuellement compatibles dans les conditions de plantation des plantes modifiées et avantages ou inconvénients sélectifs conférés à ces espèces végétales.**

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 des panicules, présence d'une bordure de maïs non-transgénique). 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 très improbables les possibilités d'obtenir des plantes descendantes d'inter-croisement suite à un flux pollinique. Combiné à l'absence d'avantage sélectif dans les conditions de culture du maïs, ce transfert peut être considéré comme un risque très minime.

Il n'existe pas en Europe d'espèces apparentées au maïs, à l'exception éventuellement de rares spécimens botaniques des genres *Tripsacum* et *Teosinte* qui pourraient être réceptrices pour ce pollen. En raison des caractères étudiés, aucun avantage ou inconvénient ne peut être conféré.

### **4. Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les plantes modifiées et les organismes cibles, tels que prédateurs, parasitoïdes et agents pathogènes peuvent avoir sur l'environnement**

Les plantes faisant l'objet de ce dossier n'ont pas vocation à agir directement sur des organismes cibles.

Aucune interaction n'est attendue entre le produit du gène *bar* et des organismes cibles. En l'absence d'application de l'herbicide sur la parcelle d'essai (hors mouillage ou pulvérisation localisée de la feuille afin de repérer les plantes transgéniques), aucun effet éventuel n'est attendu. Aucune interaction entre les produits des séquences sens ou anti-sens de gènes de la voie de biosynthèse de la lignine exprimée dans la plante et des organismes n'est attendue.

Aucune incidence n'est attendue entre le produit du gène *gus* et les organismes cibles.

L'incidence écologique de ces essais peut être considérée comme minime.

**5. Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les plantes modifiées et des organismes non cibles, notamment les incidences sur les niveaux de population des concurrents, herbivores, symbiotes, parasites et agents pathogènes.**

Aucune interaction n'est attendue entre le produit du gène de résistance au glufosinate et des organismes non-cibles. En l'absence d'application de l'herbicide sur la parcelle d'essai (hors mouillage de la feuille ou pulvérisation localisée, afin de repérer les plantes transgéniques), aucun effet éventuel n'est attendu. Aucune interaction entre les séquences sens ou anti-sens de protéines de la voie de biosynthèse de la lignine ou du gène *gus* exprimées dans la plante et des organismes n'est attendue.

**6. Effets immédiats et/ou différés éventuels sur la santé humaine résultant des interactions directes ou indirectes potentielles entre les plantes modifiées et les personnes travaillant ou entrant en contact avec la ou les plantes modifiées disséminées ou se trouvant à proximité**

A ce jour et à ce stade de l'expérimentation, nous ne disposons d'aucune indication sur une toxicité éventuelle pouvant résulter des séquences introduites.

Une étude a montré que la phosphinotricine acétyltransférase codée par le gène de résistance au glufosinate, enzyme qui détoxifie la phosphinotricine, est dégradée en quelques secondes par les sucs gastriques humains. Cette protéine, exprimée de façon constitutive dans les plantes, ne semble pas pouvoir entraîner de réponse allergique après ingestion.

La protéine *gus*, produit d'un gène de *Escherichia coli*, bactérie présente dans le tube digestif de l'homme et de nombreux animaux, n'est pas connue pour posséder une quelconque toxicité.

Aucune allergie de contact n'a été développée par les personnels de laboratoire qui manipulent depuis de nombreuses années des plantes transgéniques exprimant ces différents gènes (gène *gus*, gène *bar* de sélection et gènes de biosynthèse de la lignine).

La modification de l'expression de gènes spécifiques de la voie de biosynthèse de la lignine conduit à une modification de la composition de cette lignine dans les parois végétales.

Par ailleurs, nous avons recherché si les séquences anti-sens introduites pouvaient être la source de synthèse de nouveaux peptides. Des cadres de lecture ouverts sont présents dans les séquences anti-sens qui ont été introduites. Aucun d'eux ne présente de codon d'initiation de la traduction dans un contexte favorable (séquence consensus optimale). Par ailleurs, les peptides théoriquement synthétisables à partir de ces cadres de lecture ouverts ne présentent aucune homologie significative avec des peptides décrits dans des banques et potentiellement toxiques.

Les plantes et produits végétaux de cet essai ne seront pas consommés par l'Homme ; ils seront soit détruits, soit ramenés au laboratoire à des fins d'analyse.

### **7. Effets immédiats et/ou différés éventuels sur la santé des animaux et conséquence pour la chaîne alimentaire résultant de la consommation de la plante modifiée ou de tout produit dérivé s'il est destiné à être utilisé en tant qu'aliment pour animaux**

Les éléments qui ont été fournis ci-dessus au paragraphe 6, s'appliquent également aux animaux. Aucun effet immédiat ou différé n'est attendu, à ce stade de l'expérimentation, sur la santé des animaux.

Aucune consommation des plantes génétiquement modifiées n'est prévue, les produits végétaux de cet essai ne seront pas consommés ; ils seront soit détruits, soit ramenés au laboratoire à des fins d'analyse. On ne peut exclure que de petits animaux puissent être présents sur l'essai et consommer de faibles quantités de feuilles. Cependant aucun effet n'est à priori attendu, l'introduction d'une séquence anti-sens ne produisant pas de nouvelle protéine et les protéine phosphinothricine acétyl transférase et *gus* n'étant pas connues pour présenter de toxicité (voir ci-dessus les paragraphes 5 et 6).

### **8. Incidences immédiates et/ou différées sur les processus bio-géochimiques résultant des interactions directes et indirectes potentielles de la plante modifiée et des organismes cibles et non-cibles à proximité du ou des OGM disséminés**

Les interactions directes et indirectes, générées par la modification génétique des plantes de maïs qui font l'objet de ce dossier et les organismes cibles et non-cibles sont d'effets éventuels très limités (voir les paragraphes 4, 5 et 6). Les niveaux d'expression géniques du gène de résistance au glufosinate, le traitement des produits végétaux après la récolte, et le respect des conditions classiques de culture du maïs (façon culturale, fertilisation, irrigation, traitements herbicides, insecticides et fongicides) ne sont pas de nature, à priori, à modifier les incidences sur les processus bio-géochimiques par rapport aux incidences de la culture de maïs conventionnel.

### **9. Incidences immédiates et/ou différées, directes ou indirectes, que les techniques spécifiques de culture, de gestion, et de récolte, utilisées pour les plantes modifiées peuvent avoir sur l'environnement lorsqu'elles sont différentes de celles utilisées pour des plantes supérieures non génétiquement modifiées**

Dans le cadre de cette expérimentation, aucune incidence n'est attendue.