

SOCIETE BIOGEMMA

Demande d'autorisation auprès du Ministère de l'Agriculture

**Validation fonctionnelle d'un gène impliqué dans les
mécanismes d'assimilation de l'azote
et de remplissage du grain
Dossier B/FR/05.01.01**

BIOGEMMA
5, rue Saint-Germain l'Auxerrois
75001 PARIS
Janvier 2005

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 du second essai au champ en France pour ces événements de transformation. Le premier essai, détruit par des activistes, n'a pu fournir aucun résultat. Cette expérimentation fait suite à différentes études préalables conduites 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

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

D.12 Description des méthodes de détection et d'identification de la plante supérieure génétiquement modifiée	17
D.13 Informations, le cas échéant, sur les précédentes disséminations de la plante génétiquement modifiée	17
E. Informations concernant le site de dissémination	17
E.1 Localisation et étendue des sites de dissémination	17
E.2 Description de l'écosystème des sites de dissémination	17
E.3 Présence d'espèces apparentées sauvages sexuellement compatibles ou d'espèces végétales cultivées sexuellement compatibles	18
E.4 Proximité des sites de biotopes officiellement reconnus ou de zones protégées susceptibles d'être affectées	18
F. Information concernant la dissémination	18
F.1 Objectif de la dissémination	18
F.2 Date et durée prévues de l'opération	19
F.3 Méthode de dissémination envisagée	19
F.4 Méthode de préparation et gestion du site avant, pendant et après la dissémination, y compris les pratiques culturales et méthodes de récolte	19
F.5 Nombre approximatif de plantes	19
G. Information sur les plans de surveillance, de contrôle et de traitement du site et des déchets après dissémination	19
G.1 Précautions prises	19
G.2 Description des méthodes de traitement du site après dissémination	20
G.3 Description des méthodes de traitement après dissémination pour le matériel issu de plantes génétiquement modifiées, y compris les déchets	20
G.4 Description des plans et des techniques de surveillance	20
G.5 Description des plans d'urgence	21
G.6 Méthodes et procédures de protection du site	21
Annexe II D.2	22
Conclusions concernant les incidences potentielles sur l'environnement de la dissémination	23
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	22
2. Avantages ou inconvénients sélectifs conférés aux plante modifiées	22
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	23
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	23
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	23

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	23
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	24
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	24
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	24

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**.

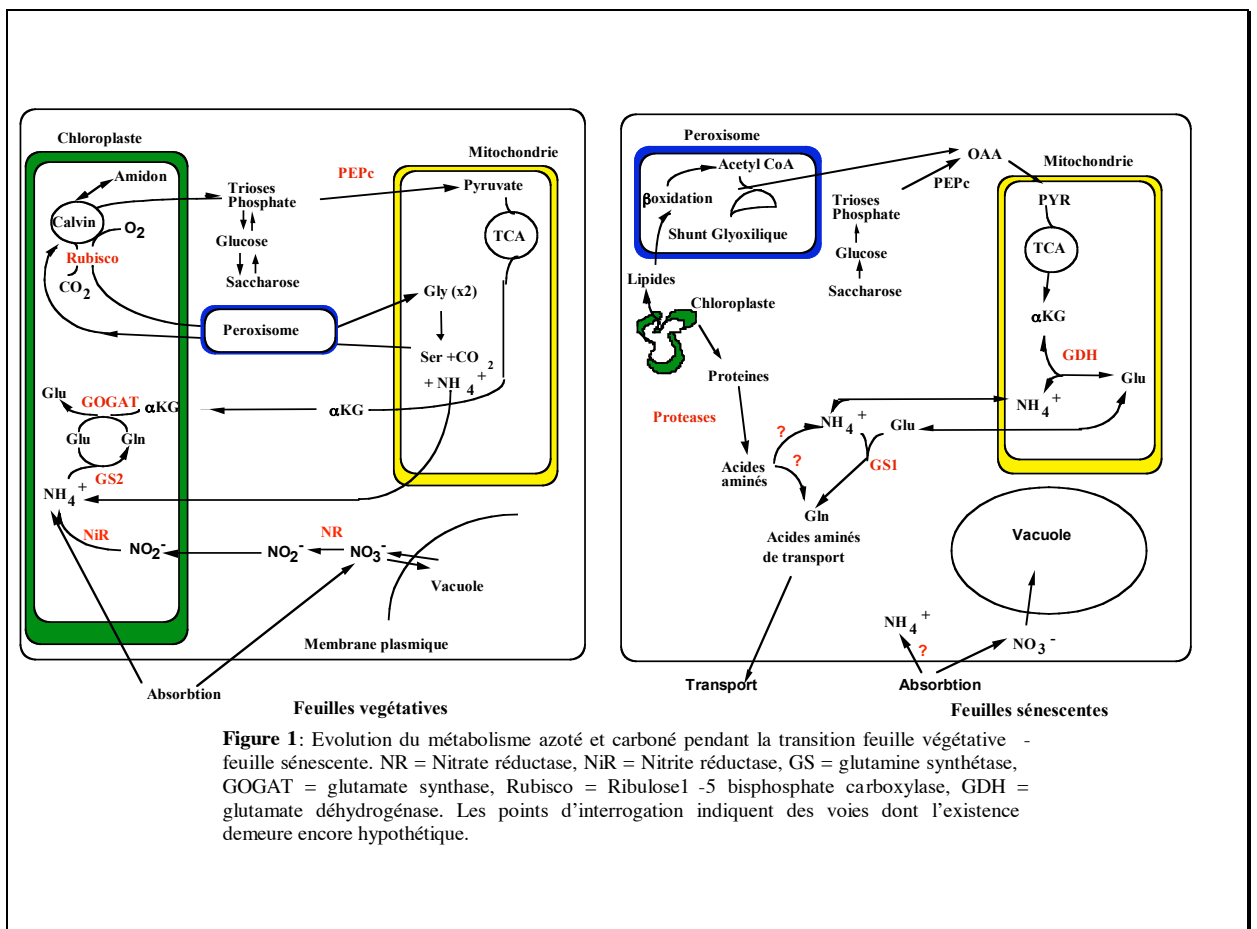
Les expérimentations au champ seront conduites par Biogemma.

INTRODUCTION

Le maïs occupe, derrière le blé, le second rang des surfaces cultivées en France, avec 3,3 millions d'hectares qui se répartissent grossièrement à égalité entre les productions de maïs grain (15 millions de tonnes) et d'ensilage. Les productions de grain sont utilisées pour moitié en nutrition animale et pour l'autre moitié dans des filières très diversifiées (amidonnerie, semoulerie, industrie papetière, etc). Le maïs est la plante qui possède la meilleure productivité à l'hectare sous nos climats.

Comme toutes les plantes, le maïs absorbe, métabolise et recycle l'azote prélevé au niveau du sol afin d'assurer sa croissance et son développement.

Pour les plantes cultivées, le nitrate, et l'ammonium dans une moindre mesure, constituent les deux principales sources primaires d'azote disponibles à partir du sol. Dans la plante, le nitrate est réduit en nitrite puis en ammonium par deux enzymes, la nitrate réductase et la nitrite réductase. L'incorporation des ions ammonium dans les molécules organiques est catalysée par le couple enzymatique glutamine synthétase (GS), glutamate synthase (GOGAT). En présence d'ATP et de Mg^{2+} , la GS synthétise la glutamine à partir de glutamate et d'ammonium ; la GOGAT catalyse la formation de glutamate à partir d'un donneur d'électrons, de glutamine et l' α -céto-glutarate (Figure 1).

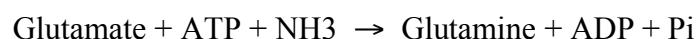


Chez les plantes, cette réaction est la principale voie métabolique permettant l'incorporation de l'azote inorganique dans une molécule carbonée, indépendamment de la source d'ammonium qui peut provenir soit de la réduction du nitrate, soit de la photorespiration, soit de la dégradation de molécules azotées organiques ou encore de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique.

Au même titre que l'assimilation primaire de l'azote inorganique, la dégradation et le recyclage des formes azotées organiques de réserve (principalement stockées sous forme de protéines) conditionnent le cycle de développement de la plante. En effet, le renouvellement des composés azotés joue un rôle déterminant dans la redistribution de l'azote organique au sein de la plante vers les organes en croissance et surtout dans le stockage des protéines dans les organes de réserve (grains, fruits, bulbes, tubercules). En général 60 à 70% des protéines des feuilles sont dégradées au cours de la sénescence, et l'azote, issu de leur dégradation, est exporté vers les jeunes organes en néoformation ou les organes de réserve en formation. Ce phénomène est bien illustré chez les céréales où, lors de la floraison, le prélèvement de l'azote inorganique du sol diminue fortement et peut cesser totalement. Le remplissage des grains en protéines de réserve se fait presque exclusivement aux dépens des nutriments azotés des organes sénescents (feuilles, tiges, racines).

Ainsi, après la floraison, la plante passe successivement d'un métabolisme assimilateur de l'azote prélevé au niveau du sol sous forme de nitrate ou d'ammonium, à un métabolisme remobilisateur assurant le recyclage de l'azote protéique stocké dans les organes aériens (feuilles, tiges). Pendant cette période, les fonctions chloroplastiques photosynthétiques et d'assimilation de l'azote réduit (Figure 1) diminuent progressivement au profit d'un métabolisme cytoplasmique assurant le recyclage des composés organiques carbonés et azotés issus de la dégradation des protéines. Ces composés sont ensuite exportés vers les organes de réserve. Au cours de ce processus on peut observer que certaines enzymes comme la glutamine synthétase catalysant l'incorporation de l'ion ammonium dans la matière organique, sont fortement exprimées ou induites selon l'espèce considérée.

La réaction catalysée par la glutamine synthétase (GS) est la suivante :



La GS est représentée par différentes isoenzymes, localisées soit dans les plastes, soit dans le cytosol. Leurs proportions relatives peuvent varier selon la plante ou l'organe étudiés ainsi qu'en fonction de facteurs externes comme le type de nutrition azotée ou l'éclaircissement. Ces différentes isoenzymes sont codées par une famille multigénique et possèdent chacune une fonction spécifique pour assimiler l'ammonium issu des différentes sources décrites précédemment. L'expression de chaque gène est, de plus, régulée en fonction du stade de développement des différents organes et de la physiologie de la plante.

En particulier, certaines isoenzymes de la glutamine synthétase semblent jouer un rôle important au cours de la ré-assimilation de l'ammonium libéré après l'hydrolyse des protéines. Par conséquent, leur fonction serait capitale dans le transfert de l'azote des organes sources (organes sénescents) vers les organes puits (fleurs, fruits, graines).

Le rôle primordial de la glutamine synthétase au cours de ce processus a été conforté par le fait qu'une sur-expression de l'enzyme dans les feuilles de lotier, de riz ou de blé transgéniques provoque une accélération de la remobilisation de l'azote protéique chez le lotier et une augmentation du rendement en grains ou de la teneur en protéines chez les céréales que sont le blé et le riz.

Chez le maïs, la GS est codée par une famille multigénique comprenant six gènes. L'un d'eux code pour une isoenzyme chloroplastique et les cinq autres pour des isoenzymes cytosoliques. Cependant, la fonction de chaque isoenzyme chez cette espèce n'est pas encore clairement définie.

Récemment, la recherche de QTLs impliqués dans l'efficacité de l'utilisation de l'azote chez le maïs a permis de mettre en évidence plusieurs co-localisations entre les gènes de structure de la glutamine synthétase, les QTLs d'activités glutamine synthétase et les QTLs du rendement en grain. Les résultats les plus marquants ont été obtenus avec un de ces gènes. Nous avons donc émis l'hypothèse que ce gène candidat joue un rôle majeur dans l'assimilation et/ou le recyclage de l'azote nécessaire au remplissage et la formation du grain.

Dans le but de valider le QTL glutamine synthétase /rendement en grains nous avons produit des plantes transgéniques de maïs sur-exprimant le gène appelé *gs-1*. Le clone cDNA de *gs-1* a été fusionné à un promoteur d'origine virale et introduit dans un plasmide contenant un gène de résistance à la phosphinothricine (herbicides Basta[®] ou Liberty[®] ou à la kanamycine) permettant la sélection de plantes transformées durant les étapes de culture *in vitro*.

L'impact de la transformation génétique sera examiné chez les plantes transgéniques cultivées au champ. En particulier, différents paramètres comme :

- la production de biomasse aérienne et racinaire,
- le rendement et la teneur en azote du grain,
- les teneurs en métabolites azotés et carbonés,
- les activités des enzymes impliquées dans l'assimilation de l'azote primaire,
- la remobilisation de l'azote protéique,

seront mesurés par rapport à des plantes témoins (non transformées) du stade jeune plante jusqu'à la phase de remplissage du grain.

A. INFORMATIONS ADMINISTRATIVES GENERALES

A.1. Nom et adresse du notifiant

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

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

A.2. Qualification et expérience des responsables scientifiques

Les équipes de chercheurs et de techniciens de Biogemma 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

<p>Validation fonctionnelle d'un gène impliqué dans les mécanismes d'assimilation de l'azote et de remplissage du grain.</p>

La présente demande concerne la mise au champ de lignées expérimentales de maïs porteuses de d'événements de transformation qui sur-expriment un gène impliqué dans les mécanismes d'assimilation de l'azote. Il s'agit de valider le rôle de ce gène, pour lesquels des informations et résultats concordent pour faire supposer qu'il intervient également dans les processus de remobilisation des ressources azotées vers le grain en cours de maturation.

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 moléculaires.

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. Nom complet

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

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

B.2. Information 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,
- Les zones au nord de la Loire (Centre, Ile-de-France, Picardie, Champagne-Ardenne).

B.6. Description de l'habitat naturel de la plante (espèces ne poussant pas habituellement 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^{ème} parallèle.

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

B.7. 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. INFORMATION 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 grâce à la technique de transformation par *Agrobacterium tumefaciens*.

La transformation par *Agrobacterium tumefaciens* est basée sur les propriétés naturelles de cette bactérie 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) ou un antibiotique (kanamycine), selon les événements de transformation. 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 autofécondées. La descendance de ces transformants sera utilisée pour l'expérimentation proposée dans ce dossier.

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.

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

Deux constructions génétiques différentes portées par le vecteur utilisé pour le transfert de gènes ont été utilisées, chacune est constituée de la séquence d'une glutamine synthétase de maïs, mise sous le contrôle un promoteur d'origine virale et d'un gène marqueur transférant une résistance à un herbicide : le glufosinate ou à un antibiotique : la kanamycine. Ce dernier gène est encadré par des éléments génétiques permettant l'excision du gène marqueur.

L'expression de ces séquences conduisent à l'augmentation du fonctionnement d'un des gènes de glutamine synthétase endogène du maïs.

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

D. 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 présentent une expression accrue de glutamine synthétase et sont résistantes au glufosinate d'ammonium ou à la kanamycine (produits herbicide ou antibiotique utilisés 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 sont 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 ou à la kanamycine. La sur-expression du gène de glutamine synthétase a été mise en évidence par analyse Western.

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 qui pourrait avoir un éventuel effet sur les performances de dissémination, n'a été mise en évidence pour les différentes générations déjà cultivées en serre (production de pollen, précocité, morphologie de l'épi, ...).

D.4.c. Capacité de survie

Cette capacité ne semble pas devoir être affectée : la résistance au glufosinate ou à la kanamycine, utilisés comme marqueurs de sélection lors de la régénération des plantes génétiquement modifiées, ne présente pas d'avantage sélectif en dehors des pressions de sélection induites par l'application de l'herbicide ou de l'antibiotique. Or ces produits ne sont pas utilisés 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 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 ou à l'antibiotique est stable sur toutes les générations où elle a été recherchée.

D.6.Modification 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.

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 ou par l'ensachage des panicules durant la période de production de pollen. La présence de bordures de plantes non-transgéniques qui constitueront un piège à pollen et la distance d'isolement (dans le cas d'une absence de castration) par rapport aux cultures commerciales de maïs limitera fortement les flux de pollen.

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

La modification génétique confère aux plantes transgéniques la résistance au glufosinate (herbicides Basta[®] et Liberty[®]) ou à la kanamycine ainsi qu'un phénotype de sur-expression de glutamine synthétase, enzyme naturellement présente dans le maïs. Ces caractères ne semblent pas devoir s'accompagner de risque particulier.

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

Une prise de position conjointe de la Commission de Génie Génétique et de la Commission du Génie Biomoléculaire sur la dispersion potentielle des gènes de résistance aux antibiotiques est disponible à l'adresse suivante :

<http://www.recherche.gouv.fr/commis/genetique/antibio/defaultb.htm>. Elle montre l'absence de risque associé à l'utilisation du gène de résistance à la kanamycine.

De façon générale, l'expression de glutamine synthétase est variable au cours de la vie de la plante et en fonction du type et de la quantité d'engrais azotés, ainsi que selon l'intensité de l'éclairage. 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 de cette protéine.

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

Les éléments fournis au paragraphe D.7 s'appliquent également aux animaux. Les plantes et produits végétaux de cet essai ne seront pas consommés par les animaux ; ils seront soit détruits, soit ramenés au laboratoire à des fins d'analyse. On ne peut exclure le fait que des animaux sauvages puissent éventuellement consommer de petites quantités de ces plantes. Dans ce cas, aucun élément d'information ne permet a priori de prédire des effets néfastes sur la santé des 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. Mécanisme d'interaction entre la plante supérieure génétiquement modifiée et les organismes cibles

Non applicable

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

Aucune interaction particulière n'est attendue avec des organismes non cibles. Les protéine phosphinothricine acétyltransférase (produit du gène de résistance au glufosinate) et néomycine phospho-transférase (produit du gène de résistance à la kanamycine) ne sont pas connues pour présenter de toxicité.

Aucune information ne laisse supposer que la sur-expression de la glutamine synthétase puisse être associée à une quelconque toxicité.

D.11. Interactions potentielles avec l'environnement abiotique

Aucune interaction de cet ordre n'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 résistance à la phosphinotricine (résistance aux herbicides Basta[®] et Liberty[®]) ou à la kanamycine. Le phénotype de modification d'expression de glutamine synthétase n'est appréciable que par analyse enzymatique ou éventuellement biochimique.

Des techniques moléculaires peuvent également être utilisées, telles que la technique de Southern, Western ou l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) sur les séquences introduites. Ces dernières permettent alors une identification fiable des plantes transgéniques portant ces deux caractères.

D.13. Informations sur les précédentes disséminations de la plante génétiquement modifiée

Seconde demande d'essais en champ pour l'ensemble des événements de transformation présentés dans ce dossier. Un premier essai au champ réalisé en 2004 a été totalement détruit par un acte de vandalisme avant que les données d'expérimentation aient pu être recueillies.

E. INFORMATIONS CONCERNANT LE SITE DE DISSEMINATION

E.1. Localisation et étendue des sites de dissémination

Les sites de dissémination pour l'année 2005 se situent en région Midi-Pyrénées et 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 approximative de 5 000 m², avec une surface maximale d'environ 1 800 m² 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 seront selon le cas :

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

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

E.3. Présence d'espèces apparentées sauvages sexuellement compatibles ou d'espèces cultivées 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 sont prises (respect d'une distance d'isolement ou castration) pour éviter toute dissémination de gènes *via* le pollen à partir des plantes transgéniques en culture.

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

Les informations sur les biotopes officiellement reconnus ou les zones protégées seront obtenues auprès des DIREN, afin de vérifier qu'ils ne seront pas affectés par la proximité des essais.

F. INFORMATION CONCERNANT LA DISSEMINATION

F.1. Objectif de la dissémination

L'objectif des disséminations est de mettre en évidence l'incidence d'une sur-expression ectopique de la glutamine synthétase sur la production de biomasse et le rendement en grain des lignées transformées, en condition de fertilisation optimale et en conditions de fertilisation azotée réduite.

Le gène de glutamine synthétase a été co-localisé avec des QTLs de remplissage du grain et des QTLs liés au métabolisme azoté. Les événements de transformation produits dans une lignée apte à la transformation génétique sont rétro-croisés dans la lignée qui porte l'allèle défavorable de la glutamine synthétase. Cette expérimentation au champ sera réalisée sur ces lignées ou sur des hybrides utilisant ces lignées comme parents.

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

Les essais proposés pour 2005 ont comme objectifs :

- de produire sur des surfaces réduites des plantes qui seront analysées (biomasse totale, teneur en glucides et protéines),
- de poursuivre les rétro-croisements sur la lignée porteuse de l'allèle défavorable et, toujours à partir de la même lignée transformée, de produire différents hybrides expérimentaux par pollinisation à l'aide de lignées mâles de comportement variable par rapport à la fertilisation azotée.

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

F.2. Date et durée de l'opération

Pour 2005, les essais sont prévus d'avril à novembre 2005.

Les autres campagnes se dérouleront d'avril à novembre 2006, 2007 et 2008.

Les semis seront effectués entre mi-avril et mi-mai, les récoltes de fin octobre à mi-novembre environ. Ces dates sont indicatives et pourront 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 les 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 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 transgénique sera de 12 000 environ.

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

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

G.1.b. Mesures 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 pour la grande majorité ou auront leur panicule ensachée (multiplication des lignées) . 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 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, biomasse) sera récolté et transféré dans un laboratoire. Les épis et semences des hybrides expérimentaux produits seront stockés puis utilisés pour des semis ultérieurs en serre ou en champ (campagne 2006, 2007 et 2008). Les surplus de matériel végétal seront détruits selon les protocoles en vigueur dans les laboratoires.

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 fin 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. Methodes 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

Le maïs est cultivé dans des agrosystèmes et n'est jamais présent en France dans des milieux naturels, ses capacités de dissémination et de repousse étant excessivement faibles. Sa propagation dans ces milieux n'est pas affectée par la modification génétique.

Les produits utilisés pour la sélection des plantes transformées en serre ou en champ – phosphinothricine, herbicide total ou kanamycine – ne sont pas homologués en Europe pour des applications sur les cultures commerciales de céréales. Ils ne seront appliqués éventuellement lors des essais que par "mouillage de la feuille", sur quelques cm² de chaque plante, ou en pulvérisation dirigée, dans le but de repérer les plantes porteuses de la modification génétique. En l'absence d'utilisation de ces produits 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 caractères sont présents dans les maïs qui font l'objet de cette expérimentation :

- une tolérance aux aminoglycosides (antibiotiques tels que la kanamycine) ainsi que la sur-expression de la protéine glutamine synthétase endogène pour cinq événements de transformation ou,
- une tolérance à l'herbicide phosphinothricine, portée par le gène de sélection qui a servi à générer les plantes transgéniques ainsi que la sur-expression de la protéine glutamine synthétase de maïs pour un événement de transformation.

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 :

- pas de traitement par l'herbicide phosphinothricine ou l'antibiotique kanamycine, si ce n'est par mouillage de la feuille 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,
- aucune pression de sélection par rapport à la sur-expression de la protéine glutamine synthétase.

3. Possibilité de transfert de gène 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.

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, mise sous poche ou établissement d'une distance d'isolement). La culture du maïs dans les agrosystèmes à partir de semences hybrides produites selon un cahier de charges rigoureux, la non-utilisation de "semences de ferme" rendent les possibilités d'obtenir des plantes descendantes d'inter-croisement suite à un flux

pollinique très improbables. Combiné à l'absence d'avantage sélectif 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 qui pourraient être réceptrices pour ce pollen et 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 de résistance au glufosinate ou le produit du gène de résistance à la kanamycine et des organismes cibles. En l'absence d'application de ces produits 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.

L'incidence de ces essais sur l'environnement 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 ou le produit du gène de résistance à la kanamycine et des organismes non-cibles. En l'absence d'application de ces produits 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.

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.

La protéine glutamine synthétase sur-exprimée est une protéine endogène du maïs. Nous n'avons pas connaissance, à ce jour, d'un effet toxique éventuellement lié à cette protéine. Les personnes ayant été en contact avec les plantes transgéniques exprimant cette protéine n'ont présenté aucun symptôme ou aucune pathologie qui seraient éventuellement liés à ce contact.

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. Aucune allergie de contact n'a été développée par les personnels de laboratoire qui manipulent depuis de nombreuses années des plantes transgéniques exprimant ce gène de sélection.

Une prise de position conjointe de la Commission de Génie Génétique et de la Commission du Génie Biomoléculaire sur la dispersion potentielle des gènes de résistance aux antibiotiques est disponible à l'adresse suivante

<http://www.recherche.gouv.fr/commiss/genetique/antibio/defaultb.htm>. Elle montre l'absence de risque associé à l'utilisation du gène de résistance à la kanamycine.

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 (voir ci-dessus les paragraphes 5 et 6).

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

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 des gènes de résistance au glufosinate et à la kanamycine, 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 biogéochimiques 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. Cependant, si le développement de plantes de maïs sur-exprimant l'enzyme glutamine synthétase devait avoir lieu, il aurait pour effet, une amélioration de l'assimilation de l'azote minéral du sol et un meilleur remplissage au niveau des grains. Un tel développement aurait pour conséquence une meilleure gestion des fertilisations azotées accompagnée d'une réduction des coûts de production agricoles et des pertes de nitrates vers les eaux de surface et souterraines. Il s'accompagnerait d'une réduction de l'utilisation des ressources énergétiques d'origine fossile.

Un tel développement aurait à priori un effet favorable sur la santé humaine, sur la santé animale, sur la microfaune et sur la faune sauvage.