

**DEMANDE D'AUTORISATION AUPRES DU MINISTERE DE L'AGRICULTURE, DE
L'ALIMENTATION, DE LA PECHE ET DES AFFAIRES RURALES**

**ESSAIS AU CHAMP PLURIANNUELS DE MAIS
GENETIQUEMENT MODIFIE EXPRIMANT UNE LIPASE
GASTRIQUE POUR DES APPLICATIONS MEDICALES**

AUTORISATION DEMANDEE POUR 2005 ET LES 3 ANNEES SUIVANTES

DOSSIER DEPOSE PAR :

MERISTEM[®] Therapeutics
8, rue de Frères Lumière
63100 CLERMONT-FERRAND

SOMMAIRE

RESUME DES POINTS PRINCIPAUX.....	5
INTRODUCTION.....	7
A. INFORMATIONS GENERALES.....	12
1. Nom et adresse du notifiant (société ou institut)	12
2. Qualification et expériences des scientifiques responsables	12
3. Titre du projet	12
B. INFORMATIONS CONCERNANT LES PLANTES RECEPTRICES.....	12
1. Nom complet	12
2a) Informations concernant la reproduction	13
i) <i>Mode(s) de reproduction</i>	13
ii) <i>Facteurs spécifiques affectant la reproduction</i>	13
iii) <i>Temps de génération</i>	14
2b) Compatibilités sexuelles avec d'autres espèces sauvages ou cultivées, y compris la répartition en Europe des espèces compatibles.....	14
3. Capacité de survie.....	14
a) <i>Capacité à former des structures de survie ou de dormance</i>	14
b) <i>Facteurs spécifiques affectant la capacité de survie</i>	14
4. Dissémination	15
a) <i>Voies et étendue de la dissémination</i>	15
b) <i>Facteurs spécifiques affectant la dissémination</i>	15
5. Distribution géographique de la plante.....	16
6. Pour les espèces qui ne poussent pas habituellement dans les Etats membres, description de l'habitat naturel de la plante y compris les informations sur les prédateurs naturels, les parasites, les concurrents et les symbiotes.....	16
7. Autres interactions potentielles, pertinentes pour l'OGM, de la plante avec des organismes dans l'écosystème habituel, ou ailleurs, y compris les informations sur sa toxicité pour les hommes, les animaux et d'autres organismes	16
C. INFORMATIONS CONCERNANT LA MODIFICATION GENETIQUE.....	17
1. Description des méthodes utilisées pour la modification génétique	17
2. Nature et source du vecteur utilisé.....	17
3. Taille, origine (nom) des organismes donneurs et fonction recherchée de chaque fragment constituant de la région envisagée pour l'insertion.....	18
D. INFORMATIONS CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE..	18
1. Description du ou des caractères et des caractéristiques qui ont été introduits ou modifiés.....	18
2. Informations sur les séquences réellement insérées ou délétées.....	19
a) <i>Taille et structure de l'insert et méthodes utilisées pour sa caractérisation, avec indication des parties de vecteur introduites dans la plante supérieure génétiquement modifiée (PSGM) ou de tout ADN vecteur ou étranger restant dans la PSGM</i>	19
b) <i>En cas de délétion, taille et fonction des régions supprimées</i>	19
c) <i>Nombre de copies de l'insert</i>	19
d) <i>Localisation de l'insert dans les cellules (intégré au génome nucléaire, chloroplastique ou mitochondrial, ou sous forme non intégrée) et méthodes utilisées pour sa détermination</i>	19
3. Informations concernant l'expression de l'insert.....	19
a) <i>Informations concernant l'expression évolutive de l'insert durant le cycle de vie de la plante et les méthodes utilisées pour sa caractérisation</i>	19
b) <i>Parties de la plante où l'insert est exprimé (Par exemple la racine, la tige, le pollen, etc.)</i>	20
4. Description des différences entre la plante génétiquement modifiée et la plante réceptrice.....	20
a) <i>Mode(s) et/ou vitesse de reproduction</i>	20
b) <i>Dissémination</i>	20
c) <i>Capacité de survie</i>	21
5. Stabilité génétique de l'insert et stabilité phénotypique de la PSGM.....	21

6.	Toute Modification de la capacité de la PSGM à transférer du matériel génétique dans d'autres organismes..	21
7.	Information concernant les effets toxiques, allergisants ou autres effets nocifs résultant de la modification génétique sur la santé humaine	23
8.	Information concernant la sécurité de la PSGM pour la santé des animaux notamment en ce qui concerne tout effet toxique, allergisant ou autre effet nocif résultant de la modification génétique, lorsque la PSGM est destinée à être utilisée dans l'alimentation des animaux	24
9.	Mécanisme d'interaction entre la plante génétiquement modifiée et les organismes cibles (le cas échéant)	24
10.	Modifications potentielles des interactions de la PSGM avec les organismes non cibles résultant de la modification génétique	24
11.	Interactions potentielles avec l'environnement abiotique.....	25
12.	Description des méthodes de détection et d'identification de la plante génétiquement modifiée.....	25
13.	Information, le cas échéant, sur les précédentes disséminations de la plante génétiquement modifiée.....	26
E.	INFORMATIONS CONCERNANT LE SITE DE DISSEMINATION	27
1.	Localisation et étendue des sites de dissémination	27
2.	Description de l'écosystème des sites de dissémination, y compris le climat, la flore et la faune.....	27
3.	Présence d'espèces végétales apparentées sauvages sexuellement compatibles ou d'espèces végétales cultivées sexuellement compatibles.....	28
4.	Proximité des sites de biotopes officiellement reconnus ou de zones protégées susceptibles d'être affectées..	28
F.	INFORMATIONS CONCERNANT LA DISSEMINATION	28
1.	Objectif de la dissémination	28
2.	Date(s) et durée prévues de l'opération	29
3.	Méthode de dissémination envisagée	29
4.	Méthode de préparation et gestion du site avant, pendant et après la dissémination, y compris les pratiques culturales et modes de récolte.....	30
5.	Nombre approximatif de plantes (ou de plante par mètre carré)	31
G.	INFORMATIONS SUR LES PLANS DE SURVEILLANCE, DE CONTROLE ET DE TRAITEMENT DU SITE ET DES DECHETS APRES DISSEMINATION	31
1.	Précautions prises	31
a)	<i>Distance(s) des autres espèces végétales sexuellement compatibles, espèces parentales et cultivées.....</i>	31
b)	<i>Mesures visant à minimiser ou à empêcher la dissémination de tout organe reproducteur de la PSGM (par exemple pollen, graines, tubercules).....</i>	31
2.	Description des méthodes de traitement du site après dissémination	31
3.	Description des méthodes de traitement après dissémination pour le matériel issu de plantes génétiquement modifiées y compris les déchets	32
4.	Description des plans et des techniques de surveillance.....	32
5.	Description des plans d'urgence	32
6.	Méthodes et procédures de protection du site.....	32
H.	CONCLUSIONS CONCERNANT LES INCIDENCES POTENTIELLES SUR L'ENVIRONNEMENT DE LA DISSEMINATION DES PLANTES SUPÉRIEURES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉES (PSGM).....	33
1.	Probabilité que les PSGM deviennent plus persistantes que les plantes parentales ou réceptrices dans les habitats agricoles ou se propagent plus rapidement dans les habitats naturels	33
2.	Avantages ou inconvénients sélectifs conférés aux PSGM	34
3.	Possibilité de transfert de gènes aux mêmes espèces ou à d'autres espèces végétales sexuellement compatibles dans des conditions de plantation de la PSGM et avantages ou inconvénients sélectifs conférés à ces espèces végétales	34
4.	Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les PSGM et les organismes cibles, tels que prédateurs, parasitoïdes et agents pathogènes peuvent avoir sur l'environnement (le cas échéant)	35
5.	Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les PSGM et les organismes non cibles (compte tenu également des interactions d'organismes avec les organismes cibles), notamment les incidences sur les niveaux de population des concurrents, herbivores, symbiotes (le cas échéant), parasites et agents pathogènes.....	35

6. Effets immédiats et/ou différés éventuels sur la santé humaine résultant des interactions directes ou indirectes potentielles entre les PSGM et les personnes travaillant ou entrant en contact avec la ou les PSGM disséminées ou se trouvant à proximité 36
7. Effets immédiats et/ou différés éventuels sur la santé des animaux et conséquences pour la chaîne alimentaire résultant de la consommation de l'OGM et des organismes cibles et non cibles à proximité du ou des OGM disséminés 37
8. Incidences immédiates et/ou différées sur les processus biogéochimiques résultant des interactions directes et indirectes potentielles de l'OGM et des organismes cibles et non cibles à proximité du ou des OGM disséminés..... 37
9. Incidences immédiates et/ou différées, directes ou indirectes, que les techniques spécifiques de culture, de gestion et de récolte utilisées pour les PSGM peuvent avoir sur l'environnement lorsqu'elles sont différentes de celles utilisées pour des plantes supérieures non génétiquement modifiées 38

RESUME DES POINTS PRINCIPAUX

Notifiant : MERISTEM[®] Therapeutics,
8 rue des frères Lumière, 63100 Clermont-Ferrand

Partenaire : LIMAGRAIN, BP1, 63720 Chappes

Titre : Essais au champ pluriannuels de maïs génétiquement modifié exprimant une lipase gastrique pour des applications médicales (pour l'année 2005 et les 3 années suivantes).

Objectif de la transformation :

Obtenir l'expression d'une lipase gastrique dans des grains de maïs en vue de la production d'un principe actif purifié destiné à des applications médicales. Cette enzyme recombinante est développée pour le traitement de la malabsorption des graisses chez les patients atteints d'insuffisance pancréatique exocrine (IPE) notamment dans le cas de la mucoviscidose.

Espèce végétale réceptrice : Maïs

Gène(s) d'intérêt introduit(s) et séquences de contrôle :

- ADNc codant pour une lipase gastrique,
- sous contrôle d'un promoteur permettant une expression ciblée dans la graine.

Autres séquences introduites :

- Gène de sélection conférant une tolérance à un herbicide (glufosinate ammonium),
- sous contrôle d'un promoteur permettant une expression constitutive.

Durée du projet : 4 ans.

Localisation des disséminations (*Pour l'année 2005*) :

- Région Auvergne (Département du Puy de Dôme).

Précautions envisagées :

- Isolement de 400 m pour les parcelles de production de semences et de 200 m pour les productions de biomasse (maïs transgénique mâle stérile ou castré) par rapport à toute culture de maïs commercial.
- Mise en place de 4 rangs de bordure de maïs non transgéniques autour des parcelles d'essai.
- Utilisation d'un système de stérilité mâle cytoplasmique pour les parcelles de production de biomasse.
- Destruction par broyage des résidus de culture en fin de récolte.
- Surveillance des éventuelles repousses pendant un an après la récolte.
- Aucune culture commerciale de maïs ne sera implantée sur les parcelles d'essai l'année suivante.
- Le maïs obtenu ne sera pas utilisé pour l'alimentation animale ou humaine.

Résumé des expériences antérieures :

- Ce projet a fait l'objet de plusieurs demandes d'autorisations pluriannuelles depuis 1995, toutes accordées après les avis favorables de la Commission du Génie Biomoléculaire (CGB). Le projet a été initié en 1995 avec du tabac puis est rapidement passé au maïs pour des raisons techniques de stabilité du produit (dossier 97/11/02 et B/FR/99.02.14). Suite à l'obtention de nouveaux événements de transformation mieux adaptés à une production à grande échelle (ne possédant pas de séquences dites extra bordures) un nouveau dossier a été déposé (B/FR/00.02.07). Cette demande est la continuation de ce dossier.
- L'ensemble des essais déjà réalisés a permis de faire la preuve de la faisabilité de la production de lipase gastrique dans des grains de maïs à l'échelle pilote (plusieurs kilogrammes de protéines obtenus) et de l'intérêt thérapeutique de cette enzyme recombinante pour l'absorption des graisses chez des malades atteints d'insuffisance pancréatique exocrine.
- Les essais ont permis de décider du choix de l'évènement de transformation et des conditions de culture et de séchage du maïs adaptées à la production de la protéine recombinante.
- Les essais ont permis de mettre en place un procédé d'extraction et de purification à l'échelle pilote.
- Les essais ont permis de montrer l'innocuité et l'efficacité de cette lipase recombinante à travers des études de toxicité chez l'animal, de pharmacodynamie et d'études pré-cliniques et cliniques Phases I et IIa "Preuve de principe" chez l'homme. Des études sur la stabilité du principe actif ont également été réalisées.

Objectifs des essais en 2005 et pour les 3 années suivantes :

- Produire des grains de maïs (biomasse) exprimant la lipase gastrique pour :
 - réaliser les études galéniques,
 - terminer l'ensemble des tests cliniques nécessaires à l'obtention de l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) avec la lipase gastrique recombinante purifiée produite à l'échelle industrielle,
 - tester le procédé d'extraction / purification à une échelle quart de grand,
 - optimiser nos travaux sur la mise en place d'une filière dédiée compatible avec les exigences réglementaires applicables à la production de principes actifs à usages thérapeutiques.
- Produire des graines de maïs (semence) exprimant la lipase gastrique pour :
 - continuer les productions de biomasse,
 - poursuivre les introgressions dans deux nouvelles lignées par sélection au champ,
 - développer deux nouveaux hybrides pour pouvoir diversifier les zones de productions.

Nombre et surface des essais (Pour l'année 2005) :

- 2 à 3 essais totalisant environ 20 hectares pour une production de grains de maïs biomasse destinés à poursuivre les études cliniques,
- 1 essai d'environ 0.5 ha pour la production de semences hybrides,
- 1 essai d'environ 3000 m² pour la production de semences de base femelle de l'hybride,
- 1 essai d'environ 3000 m² pour la production de semences de base mâle.

INTRODUCTION

Au terme de l'autorisation pluriannuelle accordée pour le dossier B/FR/00.02.07 autorisée sous le n°00/011, d'autres essais en champ qui sont la suite logique des essais réalisés depuis 1997 (dans le cadre des autorisations obtenues après les avis favorables de la CGB pour les dossiers 97.11.02, B/FR/99.02.14 et B/FR/00.02.07), font l'objet de cette notification.

Les plantes de maïs utilisées dans ces essais produisent dans leurs grains, une lipase gastrique utilisée à des fins médicales, pour traiter en particulier les troubles digestifs des patients atteints de la mucoviscidose.

La pathologie que l'on souhaite traiter

Les lipides, principalement les triglycérides à chaînes longues, constituent le principal apport calorique de l'alimentation humaine. La digestion de ces lipides dans le tube digestif (ou lipolyse) est assurée par deux enzymes naturellement produites au moment du repas, la lipase gastrique et la lipase pancréatique. Ces enzymes sont indispensables à la libération des acides gras et à leur assimilation au niveau de l'intestin grêle. Certaines affections de l'estomac et du pancréas peuvent être responsables d'une réduction, voire d'une absence, de sécrétion de ces enzymes digestives et être à l'origine de troubles nutritionnels sévères. C'est le cas notamment chez les personnes atteintes de mucoviscidose et de pancréatite chronique. L'apport d'enzymes exogènes sous forme d'extraits pancréatiques d'origine animale représente actuellement le seul traitement possible de ces maladies.

La mucoviscidose est la maladie génétique la plus fréquente dans les pays occidentaux. On estime à près de 70 000 le nombre de personnes atteintes de cette maladie dans le monde (source « *Cystic Fibrosis Foundation* »). Le mode de production de la lipase gastrique par les plantes pourrait être une alternative totale ou partielle aux extraits pancréatiques de porc actuellement utilisés et inefficaces chez environ 15% des patients atteints de mucoviscidose.

MERISTEM[®] souhaite développer cette lipase gastrique pour le traitement de la malabsorption des graisses chez les patients atteints de mucoviscidose.

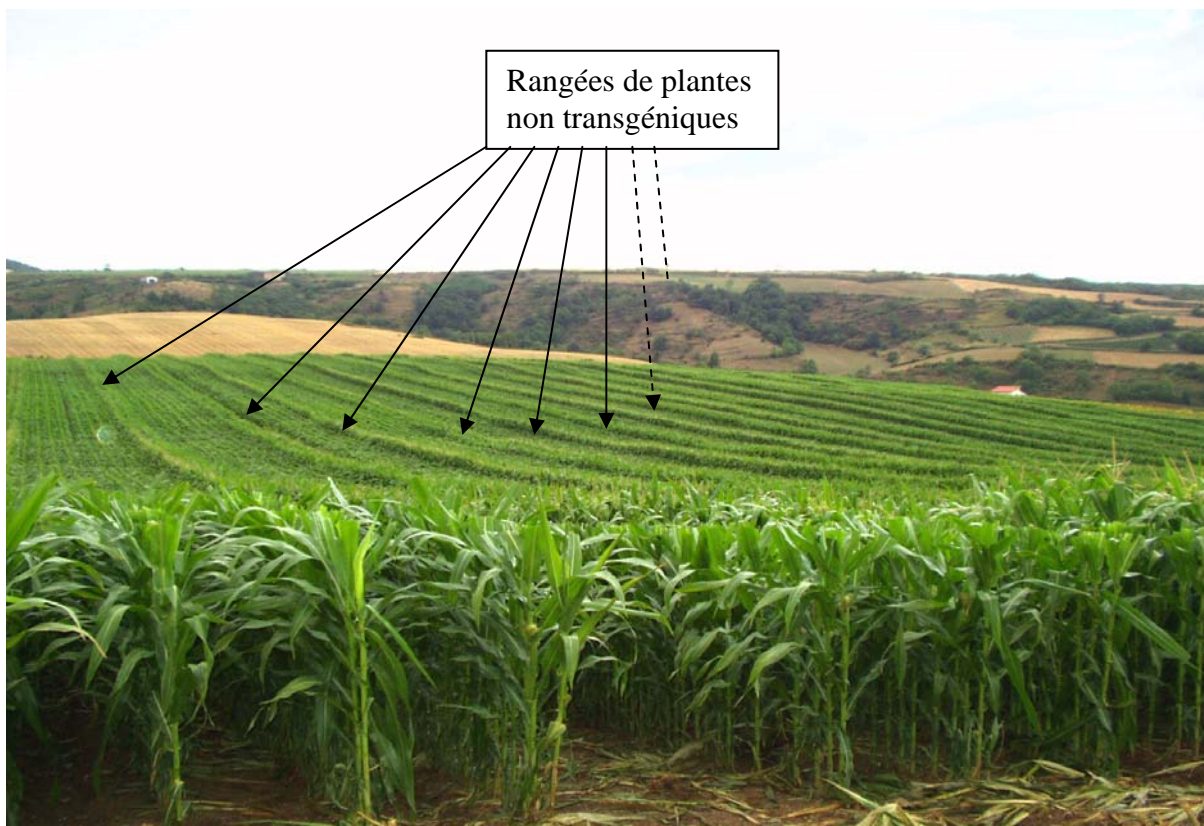
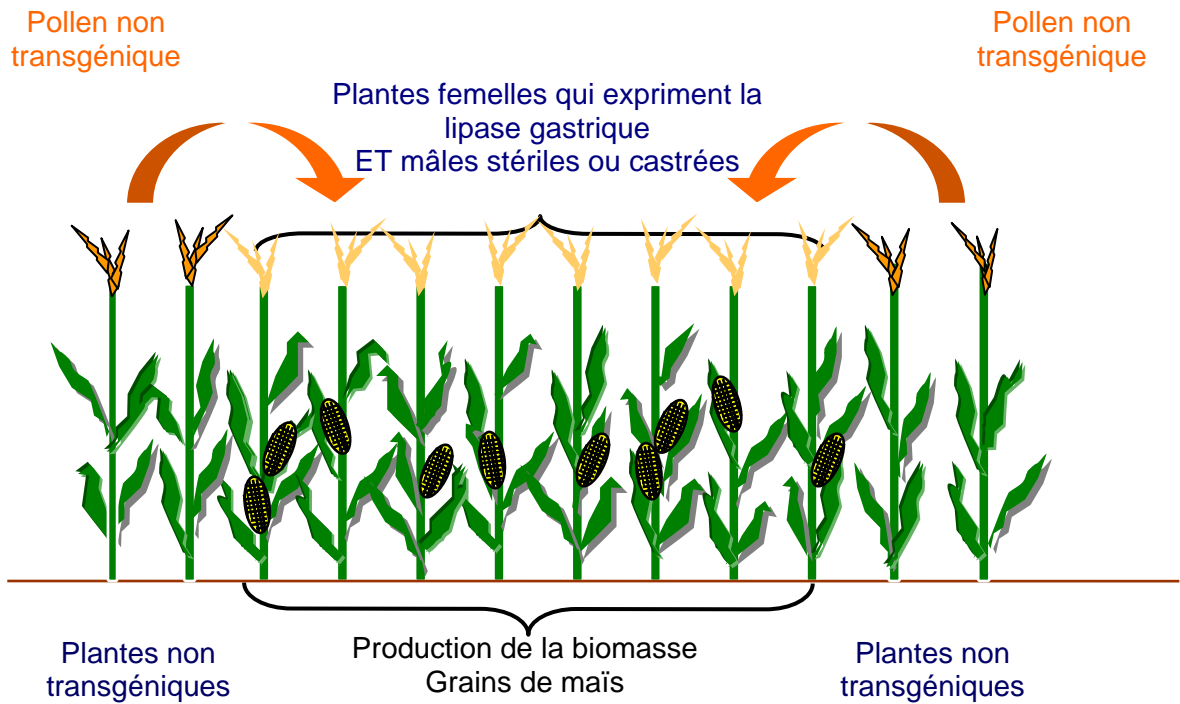
Le principe de production de lipase gastrique dans le maïs

L'information génétique, permettant la production de la lipase gastrique, a été introduite dans des cellules de maïs à partir desquelles de nouvelles plantes ont été produites. L'une de ces plantes a été sélectionnée pour ses performances à produire la lipase gastrique dans les graines et a permis d'obtenir la descendance qui fait l'objet de ce dossier.

Les maïs utilisés sont également tolérants à un herbicide, ce qui a permis de réaliser facilement leur sélection pendant les premières phases de développement.

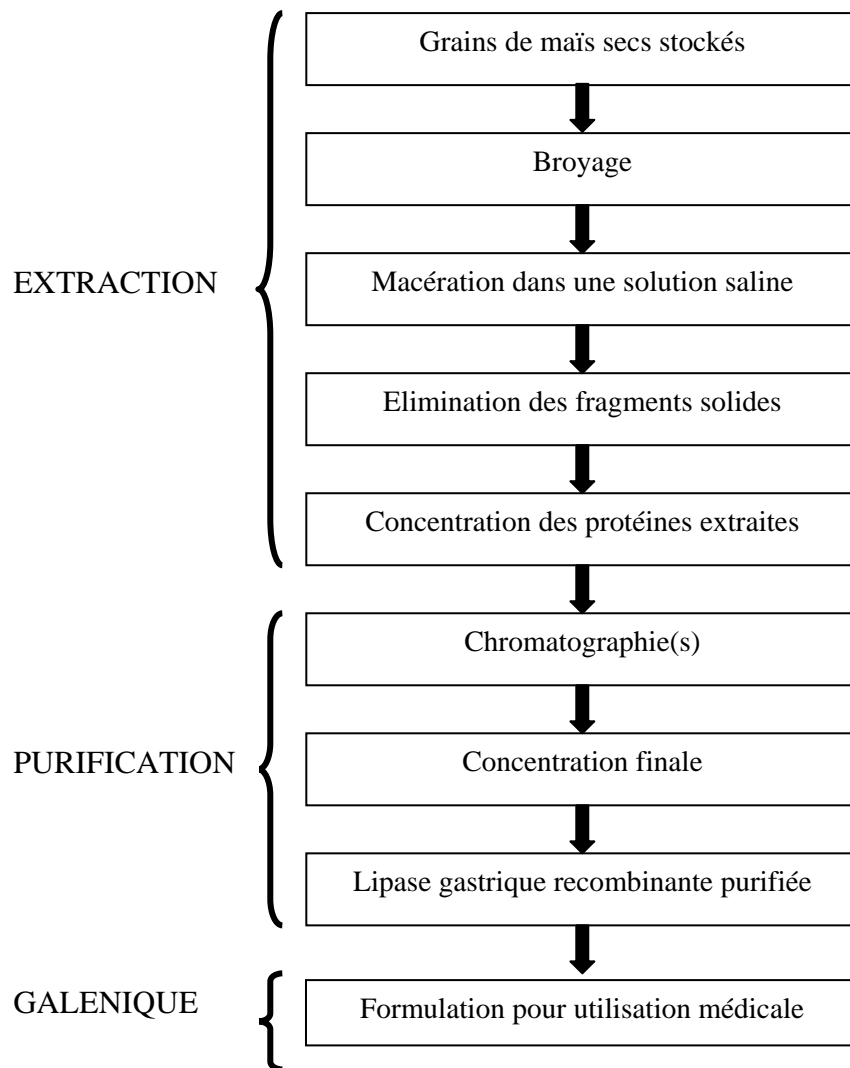
Les plantes de maïs exprimant cette lipase gastrique sont cultivées comme des maïs traditionnels sauf en ce qui concerne les mesures qui sont prises pour éviter toute dissémination incontrôlée. Les conditions de productions en plein champ seront telles que les risques de dissémination incontrôlée sont extrêmement faibles.

Il faut notamment remarquer que les productions de biomasse de maïs destinées à l'obtention de lipase gastrique se feront sans production de pollen transgénique puisque les hybrides transgéniques utilisés sont mâles stériles.



Lorsque les grains de maïs arrivent à maturité, ils sont récoltés puis, après transfert sur un site agréé, séchés à basse température, nettoyés et stockés. Si le grain n'est pas séché ou stocké correctement la lipase gastrique se dégrade.

Pour pouvoir être utilisée en tant que principe actif thérapeutique, la lipase gastrique recombinante de maïs doit être extraite de la graine puis purifiée :



Lot de lipase gastrique recombinante purifiée lyophilisée

L'avancement du projet

Les lipases et la lipase gastrique en particulier sont des protéines naturellement présentes en grande quantité dans le système digestif de tous les animaux. On trouve également des lipases chez les plantes où elles ont des fonctions métaboliques variées. La lipase gastrique a la particularité d'être active dans l'estomac, c'est-à-dire à pH acide et aux alentours de 37°C. Pour notre projet, la lipase gastrique est exprimée dans les grains de maïs. A notre connaissance et sur la base de nos observations sur le terrain, elle ne confère pas aux plantes des capacités nouvelles de multiplication et d'adaptation à l'environnement. Les essais en champ réalisés depuis 1997 n'ont montré aucun comportement particulier de ce maïs.

Ces essais en champs ont permis les productions de lipase nécessaires à la réalisation des essais de toxicologie, de pharmacodynamie ainsi que des essais cliniques de phase I et IIa. Ces études réglementaires sont conduites dans le but d'obtenir à terme une autorisation de mise sur le marché du médicament.

Plusieurs études de toxicité ont été réalisées avec des doses uniques ou répétées de cette lipase :

- Des rats ont reçu par voie orale, tous les jours pendant 4 semaines, jusqu'à 0.5 g de lipase / kg de poids corporel ; soit la quantité de lipase contenue dans une demi fois leur poids en maïs, tous les jours pendant 4 semaines.

- Des rats ont reçu par voie orale, en dose unique, jusqu'à 5 g de lipase / kg de poids corporel ; soit la quantité de lipase contenue dans cinq fois leur poids en maïs.

- D'autres essais de toxicité ont été menés avec des mini-porcs, des chiens et des singes.

Dans aucun cas, quelque soit la dose utilisée il n'a été constaté de toxicité.

En ce qui concerne les essais de pharmacodynamie et les premières phases d'essais cliniques, plus de soixante patients volontaires (sains ou atteints d'insuffisance pancréatique exocrine) ont été traités par voie orale avec de la lipase gastrique recombinante. Certains sujets ont été traités avec des doses de lipase équivalent à 3 kg de maïs (dose unique), d'autres ont reçu l'équivalent de 900 g de maïs par jour pendant 10 jours. Aucun effet indésirable sévère n'a été détecté.

La lipase gastrique recombinante a été bien tolérée et a fait la preuve de son efficacité pour la digestion des graisses que ce soit en complément des extraits pancréatiques utilisés en pratique courante, ou en monothérapie.

Les expérimentations envisagées

Les essais cliniques doivent être poursuivis avec la lipase gastrique dans sa forme galénique définitive en vue d'optimiser son efficacité clinique. Le procédé d'extraction / purification doit être développé au niveau semi industriel. Environ 5 tonnes de maïs sont nécessaires à l'obtention d'un kilogramme de lipase gastrique purifiée. Les essais de mise au point industrielle et les essais de galénique nécessitent chacun à eux seuls plusieurs kilogrammes de lipase gastrique recombinante. L'essai clinique de Phase III destiné à évaluer sur le long terme la tolérance et l'efficacité de la lipase gastrique demandera plusieurs dizaines de kilogrammes de principe actif. C'est pourquoi le développement de ce projet passe par des productions de biomasse de plusieurs dizaines d'hectares : environ 20 en 2005 jusqu'à une centaine en 2008.

Les études prévisionnelles de marché montrent un besoin d'environ une tonne de principe actif par an, soit environ 5000 tonnes de maïs à produire au champ chaque année, ce qui, compte tenu des dispositifs de culture, devrait correspondre à une surface de maïs cultivée d'environ 1000 hectares. Les productions en plein champ sont donc indispensables si l'on veut disposer d'un produit à un coût compétitif pour les patients et les organismes de santé publique. Les biomasses produites au cours de ces différents essais permettront également d'acquérir des données sur la fiabilité du système de production et de la reproductibilité de la qualité du principe actif extrait et purifié.

En parallèle, des productions de semences seront réalisées afin d'être en mesure de poursuivre les essais de production de biomasse sur plusieurs années. Ces parcelles de multiplication de semences avec production de pollen porteur de l'évènement de transformation sont indispensables à l'obtention d'une biomasse de qualité. Ces parcelles représentent au plus quelques pourcents des surfaces de production de biomasse et sont réalisées avec des mesures d'isolement géographique strictes. Deux nouveaux hybrides de maïs seront testés avec le même évènement de transformation afin de pouvoir diversifier les zones de culture possibles et d'avoir plusieurs alternatives si l'une des lignées devait être abandonnée.

Il faut rappeler que la lipase gastrique n'a montré aucune toxicité à des doses bien supérieures aux quantités de maïs habituellement consommées. En outre, la lipase gastrique est une protéine qui perd son activité lorsqu'elle est amenée à des températures élevées comme celles qui sont habituellement utilisées pour le séchage de maïs grain ou sa cuisson (> 100°C).

L'environnement réglementaire médical

Les instances réglementaires européennes et américaines s'intéressent à ce mode de production et ont initié une réglementation relative à la production de protéines recombinantes à usage thérapeutique dans les plantes :

- Points to consider for production of recombinant proteins in transgenic plants (draft). EMEA.
- Draft guidance for industry: medicinal products from bioengineered plants for use in humans and animals. USDA-FDA.

En juillet 2003, la lipase gastrique recombinante produite dans le maïs a reçu le statut de médicament orphelin pour l'Europe. Les médicaments orphelins sont des médicaments utilisés pour le diagnostic, la prévention ou le traitement de maladies létales ou très graves qui atteignent un nombre réduit de patients de la communauté européenne.

A. INFORMATIONS GENERALES

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

Société MERISTEM® Therapeutics
8, rue des frères Lumière
63100 Clermont-Ferrand

2. Qualification et expériences des scientifiques responsables

- Directeur Bio Industriel, Ingénieur INSA Toulouse, Docteur Ingénieur en Fermentation, plus de 20 ans d'expérience en production biotechnologique dont 15 ans au sein du Groupe Roussel Uclaf.
- Directeur Recherche, Docteur en Physiologie et Biochimie, 17 ans d'expérience en biotechnologie.
- Directeur des Affaires Médicales et Réglementaires, Docteur en Médecine, 15 ans d'expérience sur le développement et l'enregistrement de médicaments en particulier au sein du groupe Dolisos.
- Responsable Production Végétale, D.E.A. Biologie et Physiologie Végétale, 17 ans d'expérience en biotechnologie végétale.

Chaque essai est mené par des ingénieurs et techniciens qualifiés ayant déjà mis en place et suivi différents essais en champ du même type et de types différents en France et à l'étranger et cela pendant plusieurs années.

Les agriculteurs intervenants sont formés et encadrés par du personnel de MERISTEM® Therapeutics.

3. Titre du projet

Essais au champ pluriannuels de maïs génétiquement modifié exprimant une lipase gastrique pour des applications médicales (Pour l'année 2005 et les 3 années suivantes).

B. INFORMATIONS CONCERNANT LES PLANTES RECEPTRICES

1. Nom complet

Zea mays ssp. mays

- Nom de famille : *Poaceae*
- Genre : *Zea*
- Espèce : *mays*
- Sous-espèce : *mays*
- Cultivar/lignée :
 - Hybride présentant une stérilité mâle cytoplasmique
 - Lignées parentales mâles, mâles fertiles mainteneuses de stérilité cytoplasmique

- Lignées parentales femelles, mâle stérile et mâle fertile mainteneuse de stérilité cytoplasmique
- f) Nom usuel : maïs

2a) Informations concernant la reproduction

i) *Mode(s) de reproduction*

Le maïs est une plante monoïque possédant deux inflorescences (mâle et femelle) distinctes :

- Les fleurs mâles, groupées en panicule au sommet de la tige, ne portent que des étamines entourées de glumelles. Elles apparaissent avant les fleurs femelles (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. Selon les variétés, un épi de maïs comprend 300 à 500 fleurs.

La reproduction est assurée par la libération du pollen contenu dans les étamines par ouverture des sacs polliniques (ou anthères). Le pollen libéré tombe de la panicule par simple gravité et est transporté par le vent. Il arrive ainsi sur les soies, permettant la fécondation. Dans les minutes qui suivent son arrivée sur la soie, le grain de pollen émet un tube pollinique. Celui-ci progresse rapidement dans la soie et arrive en moins de 24 heures jusqu'à l'ovule. Plusieurs dizaines de grains de pollen peuvent "germer" dans une même soie, mais un seul parviendra à l'ovule et assurera la fécondation.

Pour une seule panicule, la libération totale du pollen dure 8 à 10 jours. L'émission du pollen se fait surtout le jour mais débute très peu de temps après le lever du soleil. Elle passe par un maximum au milieu de la matinée. En cas de pluie ou d'irrigation, la déhiscence des anthères est limitée et le pollen reste enfermé dans les loges des étamines. La durée de vie du pollen est généralement de quelques dizaines de minutes à quelques heures seulement.

Le mode de reproduction est dit allogame (se dit d'un individu ou une population dont le mode préférentiel de reproduction est l'allogamie, mode de reproduction sexuée dans lequel la fécondation d'un gamète femelle est assurée par un gamète mâle d'un autre individu) anémophile (pollinisation par le vent).

ii) *Facteurs spécifiques affectant la reproduction*

Du fait de la monœcie et du décalage dans le temps de la maturité mâle et femelle, la fécondation croisée est favorisée (allogamie). En conditions naturelles la fécondation croisée est supérieure à 95%. Un faible taux d'autofécondation est tout de même possible (inférieur à 5%). Néanmoins, dans le cas des productions de sélection de semences classiques, l'homme peut diriger ces croisements dans un sens comme dans l'autre et ainsi favoriser les autofécondations par exemple. Donc l'homme peut être un facteur important affectant la reproduction.

Le principal mode de transport du pollen étant le vent et le pouvoir de fertilité et la viabilité du pollen étant relativement fragiles et courts, les conditions climatiques ont un rôle important pouvant affecter la reproduction. En général la viabilité du pollen est de 10 à 30 minutes, mais elle peut être plus longue lorsque les conditions sont favorables (Coe et al., (1988) *The Genetics of Maize*). Dans

des conditions de températures élevées et de dessiccation, la viabilité du pollen est de l'ordre de quelques minutes ; ces conditions peuvent même abîmer la panicule avant que du pollen viable soit émis.

Il est également important d'avoir du pollen en quantité suffisante, bien réparti et au bon moment pour avoir une bonne fécondation. Les pratiques culturales sont également un facteur important pouvant affecter la reproduction.

iii) Temps de génération

Le maïs est une plante annuelle avec un temps de génération (cycle de culture) court. Généralement, le cycle de culture, du semis à la récolte des grains, peut être estimé à environ 7 mois. Le semis, en France, a lieu à partir du mois d'avril et la récolte en octobre-novembre. Le cycle de culture dépend des variétés utilisées (plus ou moins précoces) et de l'utilisation de la culture (maïs fourrage, maïs grain...).

2b) Compatibilités sexuelles avec d'autres espèces sauvages ou cultivées, y compris la répartition en Europe des espèces compatibles

Le maïs est une plante graminée sub-tropicale annuelle originaire d'Amérique centrale et n'a pas d'habitat naturel en France. Les espèces les plus proches du maïs sont la Téosinte, graminée sauvage d'Amérique centrale (Mexique essentiellement) et le genre apparenté *Tripsacum*. Les espèces voisines de *Zea* sont limitées sur le plan géographique et se trouvent au Mexique et au Guatemala. Seule la Téosinte peut se croiser avec le maïs dans des conditions naturelles.

Il n'y a donc pas d'hybridation interspécifique possible en France du fait de l'absence d'espèces voisines ou apparentées se développant spontanément sur le territoire français.

3. Capacité de survie

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

Le maïs est une plante annuelle qui se reproduit par ses graines et ne présente pas de moyens de reproduction végétative en conditions naturelles. Les semences sont nombreuses mais leur viabilité est fortement limitée car elles sont très sensibles aux maladies et au froid. En règle générale, seuls les épis non battus peuvent permettre aux grains de conserver éventuellement une capacité de germination l'année suivante.

Il n'y a donc en général pas ou très peu de repousses à la suite d'une culture de maïs et si des repousses apparaissent dans les jours suivant la récolte, les plantules sont détruites par le froid et n'atteignent pas le stade reproductif.

b) Facteurs spécifiques affectant la capacité de survie

Les facteurs affectant la capacité de survie sont nombreux pour le maïs ; la survie des graines dépend des conditions climatiques (température, humidité), de l'humidité de la graine, de la protection de l'enveloppe, du stade de développement et des pathogènes en présence.

Les conditions climatiques hivernales de manière générale ne permettent pas la repousse de cette plante. Le gel a un effet très négatif sur le pouvoir germinatif des graines.

Les pratiques agricoles courantes conduisent également à la destruction des graines.

4. Dissémination

a) Voies et étendue de la dissémination

Les deux formes de dissémination sont les graines et le pollen.

Au cours de sa domestication à partir de la Téosinte, le maïs a gagné de nombreux attributs importants sur le plan agronomique. Sa domestication est telle que les grains ne peuvent tomber de l'épi et se disséminer sans intervention extérieure. Les grains de maïs sont peu résistants au froid. Les plants croissent parfois dans des champs non cultivés, en bordure des routes ou spontanément dans les cultures l'année qui suit une récolte de maïs, mais ce dernier est incapable de se reproduire de façon soutenue s'il n'est pas cultivé, et il n'envahit pas les habitats naturels (*Gould, F.W. (1968) Grass systematics, p. 1-382. Mc Grow Hill ; N.Y.*).

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

Si du pollen viable de maïs est apporté par le vent sur des stigmates réceptifs d'un autre maïs, une fécondation croisée peut se faire. Ce transfert potentiel devient de plus en plus improbable quand :

- La période de viabilité du pollen (30 minutes en moyenne) est affectée par de mauvaises conditions climatiques,
- La distance entre les deux maïs augmente. Une distance de séparation de 200 m est reconnue comme permettant de produire des semences aux normes de pureté internationalement autorisées (normes de certification OCDE).
- La masse pollinique est importante (phénomène de dilution).

b) Facteurs spécifiques affectant la dissémination

Les facteurs affectant la dissémination par l'intermédiaire des graines sont :

- Les conditions climatiques : les graines sont très sensibles au froid (gel hivernal notamment),
- La physiologie de la graine : très peu de capacité de survie en milieu naturel,
- La morphologie de l'épi : les graines, fortement liées à la rafle, et les spathes, protégeant les graines, rendent la dissémination des graines difficile sans l'intervention humaine,
- Les maladies et faune pathogène de la graine,
- L'homme qui est le facteur le plus déterminant. Il réalise les semis dans un espace agricole déterminé.

Les facteurs affectant la dissémination par l'intermédiaire du pollen sont :

- Les conditions climatiques : Le pollen provenant de l'inflorescence mâle est dispersé par gravité et par le vent. Sa dissémination est liée à la présence du vent,
- La physiologie du pollen : Le pollen a une durée de vie naturellement faible. Celle-ci diminue avec des conditions climatiques défavorables (forte température, humidité ambiante élevée). Le début de la libération du pollen a lieu généralement deux ou trois jours avant l'apparition des soies des épis (protandrie). La durée de floraison des fleurs mâles est d'environ 6 à 10 jours. La libération du pollen se fait principalement dans la matinée. La présence de soies réceptives au moment de la pollinisation est également un facteur de dissémination,
- L'homme : dans le cas de croisements contrôlés lors des productions de semences, l'homme réalise la dissémination du pollen de manière contrôlée.

5. Distribution géographique de la plante

Le maïs est dépendant de l'homme pour sa dispersion géographique. Le maïs est une plante cultivée utilisée, soit comme ensilage, soit pour sa production de grains (Maïs consommation, semence et doux). Il s'agit d'une des plus importantes cultures céréalières du monde.

L'Union Européenne est le 4^{ème} producteur mondial de maïs. La France est un des principaux producteurs de maïs en Europe :

La production française de maïs (fourrage et grain) est localisée principalement dans les régions suivantes :

- Façade atlantique (de la Normandie jusque dans le Midi Pyrénées)
- Les régions Grand Ouest avec notamment les régions Centre et Poitou-Charentes
- L'Est avec notamment les régions Rhône-Alpes et Alsace
- La zone Nord-Loire (Centre, Ile-de-France, Picardie, Champagne-Ardenne...)

6. Pour les espèces qui ne poussent pas habituellement dans les Etats membres, description de l'habitat naturel de la plante y compris les informations sur les prédateurs naturels, les parasites, les concurrents et les symbiotes

Vieux de plusieurs milliers d'années, le « mahiz », ramené par Christophe Colomb d'Amérique centrale, a beaucoup voyagé et a été adapté sous des latitudes variées. Il est aujourd'hui présent sur les cinq continents, à travers des milliers de variétés différentes, poussant aussi bien en Europe que dans les régions semi-arides d'Amérique Centrale ou dans les zones humides d'Asie du Sud-Est. Cependant, les exigences climatiques du maïs ne lui permettent pas une aire de culture dans le monde aussi étendue que celle du blé, sa production étant plutôt concentrée dans l'hémisphère nord. En climat continental (Canada, URSS), le maïs est cultivé jusqu'au 60ème parallèle.

Le maïs est une plante sub-tropicale originaire d'Amérique centrale qui ne se développe pas en dessous de 9 - 10°C. Son habitat naturel étant chaud et humide, le maïs a une température optimale de croissance de 30 - 33° C et des besoins hydriques importants à certains stades de son développement.

Le maïs est sensible à de nombreux parasites et ravageurs. Les plus importants sont les parasites fongiques (*Fusarium spp.*, *Ustilago maydis*, *Sphacelothecia reliana*), les insectes (Taupins, Pyrale, Sésamie, Chrysomèle, Pucerons du maïs, Mouche des semis, Noctuelle Ipsilon, Scutigérelle) et les vers (*Heliothis zea*, *Elaterid spp.*). Les cultures de maïs peuvent également être attaquées par des oiseaux (corneilles) et animaux sauvages (cerfs, sangliers).

7. Autres interactions potentielles, pertinentes pour l'OGM, de la plante avec des organismes dans l'écosystème habituel, ou ailleurs, y compris les informations sur sa toxicité pour les hommes, les animaux et d'autres organismes

Le maïs avec le blé et le riz est l'une des plantes les plus cultivées au monde. Récolté en grain ou en fourrage, il a une très grande part dans l'alimentation animale et humaine. La plante n'est pas considérée comme étant dangereuse ou ayant des effets toxiques pour les hommes, les animaux et autres organismes.

Dans l'environnement, le maïs a des interactions avec des insectes, des oiseaux et des mammifères. Le maïs est également sensible à certaines maladies dues essentiellement à des champignons (anthracnose, helminthosporiose, fusariose, charbon, mildiou).

En ce qui concerne les organismes végétaux, l'interaction est très limitée par les techniques agricoles puisque le maïs est présent sur des terres cultivées. Les mauvaises herbes (liseron, *Imperata cylindrica*) sont généralement en compétition avec les plantes en cultures surtout avec les jeunes plantes et sont source d'appauvrissement du sol ce qui explique leur élimination dans les grandes cultures.

C. INFORMATIONS CONCERNANT LA MODIFICATION GENETIQUE

1. Description des méthodes utilisées pour la modification génétique

La méthode utilisée est la transformation biologique par *Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie a la propriété de réaliser naturellement la transformation génétique d'une plante, afin de la parasiter. Une construction génétique est introduite dans la bactérie, rendue avirulente au préalable. La bactérie transfère cette construction (partie ADN-T, pour ADN Transféré qui comprend le gène d'intérêt, le gène marqueur et les séquences contrôlant leur expression, cf. paragraphe D.1) dans la plante qui l'intègre à son génome. C'est une technique couramment utilisée. Cette technique est décrite par Ishida *et al.* (*Nature Biotechnology* (1996) 14 :745-750). Elle est connue pour générer un faible nombre de copies (le plus souvent de 1 à 5 copies) et un faible nombre de sites d'insertion.

Des embryons immatures d'une lignée de maïs dont l'aptitude à la régénération en milieu artificiel est élevée, sont mis en co-culture *in vitro* avec *Agrobacterium tumefaciens* pour être transformés. Après quelques jours, les embryons sont transférés dans un autre milieu de culture contenant un herbicide (glufosinate ammonium) utilisé comme agent sélectif. Seuls les cellules ayant été transformées tolèrent cet herbicide et forment des cals. Dans des conditions appropriées, les cals se développent en plantules. Celles-ci sont acclimatées en chambre de culture puis en serre.

Lors de la transformation génétique, une ou plusieurs copies de l'ADN-T peuvent s'insérer à différents endroits du patrimoine génétique de la cellule végétale. Afin de s'assurer que le gène introduit s'exprime et produit la protéine désirée, en quantité suffisante et avec la qualité requise, des analyses biochimiques sont réalisées sur les graines. Pour caractériser les événements de transformation retenus des analyses moléculaires sont effectuées.

Au cours de précédentes expérimentations (dossier B/FR/00.02.07), un événement de transformation, T019H2 a été sélectionné. La descendance de cet événement de transformation sera utilisée pour les expérimentations proposées dans ce dossier.

2. Nature et source du vecteur utilisé

Événement de transformation	Plasmide
T019H2	pMRT1075

Le plasmide pMRT1075 diffère de pSB1 (Komari *et al.*, 1996, *Plant J.* 10 :165-174) par l'introduction entre les bordures droite et gauche de 2 cassettes d'expression, à savoir :

- la cassette d'expression de l'ADNc codant la lipase gastrique canine.

Le promoteur du gène γ zéine du maïs contrôle l'expression de l'ADNc codant la lipase gastrique canine fusionné à la séquence codant le peptide signal de lipase gastrique de lapin. La séquence se termine par l'extrémité 3' du gène de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*.

- la cassette d'expression du gène bar.

Le promoteur et l'intron 1 du gène de l'actine du riz contrôlent le gène bar de *Streptomyces hygroscopicus*. La séquence se termine par l'extrémité 3' du gène de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Les informations détaillées, concernant la nature et la source du vecteur utilisé, sont fournies aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire (CGB), chargée de l'évaluation des risques pour la santé publique et l'environnement, dans l'annexe confidentielle jointe à cette notification. La confidentialité de ces informations est liée aux obligations de protection du secret industriel.

3. Taille, origine (nom) des organismes donneurs et fonction recherchée de chaque fragment constituant de la région envisagée pour l'insertion

La construction génétique utilisée confère aux plantes la capacité à produire une lipase gastrique spécifiquement dans l'albumen de la graine et la tolérance à un herbicide (glufosinate ammonium) exprimée dans toute la plante et utilisée comme marqueur de sélection des cellules transformées. L'expression de ces deux caractères est sous contrôle par des séquences promotrices et terminatrices.

Les informations détaillées, concernant la taille, l'origine des organismes donneurs et la fonction recherchée de chaque fragment constituant de la région envisagée pour l'insertion, sont fournies aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire (CGB), chargée de l'évaluation des risques pour la santé publique et l'environnement, dans l'annexe confidentielle jointe à cette notification. La confidentialité de ces informations est liée aux obligations de protection du secret industriel.

D. INFORMATIONS CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE

1. Description du ou des caractères et des caractéristiques qui ont été introduits ou modifiés

Une construction génétique a été introduite.

Gène	Fonction	Caractéristique
Lipase (LGC)	Lipase gastrique (= protéine intérêt)	Enzyme qui hydrolyse <i>in vivo</i> les glycérides à chaînes longues qui représentent la majorité des graisses consommées par l'homme. Sur la base de nos connaissances, cette protéine ne confère aucune propriété particulière à la plante. L'enzyme reste stockée dans le grain. C'est cette protéine qui sera extraite et purifiée.
bar	Phosphinothricine N-acétyl-transférase qui détoxifie la phosphinothricine (substance active de l'herbicide glufosinate ammonium) par acétylation.	Enzyme qui induit une tolérance de la plante à l'herbicide glufosinate ammonium. L'expression de cette protéine est utilisée pour la sélection des plantes transformées.

2. Informations sur les séquences réellement insérées ou délétées

a) Taille et structure de l'insert et méthodes utilisées pour sa caractérisation, avec indication des parties de vecteur introduites dans la plante supérieure génétiquement modifiée (PSGM) ou de tout ADN vecteur ou étranger restant dans la PSGM

Les résultats obtenus montrent qu'aucune séquence plasmidique située hors de l'ADN-T n'est présente dans le génome du transformant primaire T019H2.

Les informations détaillées, concernant la taille et structure de l'insert et les méthodes utilisées pour sa caractérisation, sont fournies aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire (CGB), chargée de l'évaluation des risques pour la santé publique et l'environnement, dans l'annexe confidentielle jointe à cette notification. La confidentialité de ces informations est liée aux obligations de protection du secret industriel.

b) En cas de délétion, taille et fonction des régions supprimées

Non applicable dans ce dossier.

c) Nombre de copies de l'insert

Les résultats obtenus montrent qu'au moins 2 copies de l'ADNc codant pour la lipase gastrique sont présentes dans les descendants du transformant primaire T019H2.

Les informations détaillées sont fournies aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire (CGB), chargée de l'évaluation des risques pour la santé publique et l'environnement, dans l'annexe confidentielle jointe à cette notification. La confidentialité de ces informations est liée aux obligations de protection du secret industriel.

d) Localisation de l'insert dans les cellules (intégré au génome nucléaire, chloroplastique ou mitochondrial, ou sous forme non intégrée) et méthodes utilisées pour sa détermination

L'insert est intégré au génome nucléaire par la technique de transformation par *Agrobacterium tumefaciens*. L'insert est transmis de manière mendélienne dans la descendance (cf. paragraphe D5).

3. Informations concernant l'expression de l'insert

a) Informations concernant l'expression évolutive de l'insert durant le cycle de vie de la plante et les méthodes utilisées pour sa caractérisation

L'expression de l'insert a été suivie régulièrement depuis l'obtention de cet événement de transformation en 1998.

Concernant l'expression de la partie codante de la lipase gastrique :

Le promoteur du gène γ zéine de maïs qui contrôle l'expression de l'ADNc codant la lipase gastrique, est spécifique de l'albumen du grain. Des essais préliminaires avec un gène rapporteur

placé sous contrôle de ce même promoteur n'ont permis de détecter aucune expression significative dans d'autres organes.

La lipase gastrique peut être détectée par la technique de Western blot au moyen d'anticorps spécifiques. L'activité de cette protéine est également régulièrement déterminée par une technique de titrimétrie. La technique employée est fondée sur celle de *Gargouri et al. (Gastro-enterology – 1986, 91,919-925)* et *Carrière et al. (Eur.J.Biochem, 202, 75-83 (1991))*. En présence d'un substrat (la tributyrine), la lipase provoque la libération d'ions H_3O^+ . La quantité de soude nécessaire pour neutraliser les ions H_3O^+ ainsi libérés est directement liée à l'activité lipasique du produit à tester.

Des études ont montré que la quantité de lipase extractible avait tendance à diminuer avec la dessiccation du grain.

Concernant l'expression de la partie codante de la Phosphinothricine N-acétyl-transférase (PAT) :

Le promoteur du gène actine 1 de riz qui contrôle l'expression du gène bar, codant pour la protéine PAT, est constitutif.

L'expression de cette protéine est montrée en observant le phénotype de la plante après une application de glufosinate ammonium. Ce test de sélection est réalisé en laboratoire et en serre. La détection de la protéine PAT est également recherchée à l'aide de « Strip Test » permettant d'avoir une réponse rapide (quelques minutes) sur sa présence ou non. Ce moyen d'analyse est basé sur les techniques immuno-enzymatiques.

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

La partie codante de la PAT conférant la tolérance au glufosinate ammonium est sous contrôle d'un promoteur constitutif.

La partie codante de la lipase gastrique est sous contrôle d'un promoteur permettant une expression ciblée dans l'albumen des grains. Des analyses par western blot n'ont pas permis de mettre en évidence de lipase gastrique dans la tige, la feuille, la racine et le pollen (seuil de détection 0.01% des protéines solubles totales).

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

a) Mode(s) et/ou vitesse de reproduction

Au cours des nombreuses cultures en serre et en plein champ effectuées avec des maïs ayant intégré cet événement de transformation, aucune modification de mode, ou de vitesse de reproduction n'a été observé par rapport aux plantes non modifiées.

Régulièrement, des plantes non transformées sont cultivées dans les parcelles expérimentales, en tant que témoins pour les parcelles de production de semences ou en tant que pollinisatrices pour les parcelles de production de biomasse. Au cours de ces essais, aucune différence ou anomalie particulière n'a été relevée par le personnel en charge de ces opérations.

b) Dissémination

Au cours des différents essais réalisés en serre et en plein champ, aucune différence sur la capacité de reproduction des plantes transformées et en particulier sur le pollen ou sur les grains, n'a été relevée par le personnel en charge des cultures. De même, aucun effet sur la capacité de dissémination n'a été constaté.

c) *Capacité de survie*

De nombreux essais ont été réalisés en serre et en plein champ afin de produire des semences exprimant cette protéine intérêt. Aucune modification de la faculté germinative des semences récoltées n'a été observée par rapport à des semences de même variété et non transgéniques.

En ce qui concerne la tolérance au glufosinate ammonium, cette caractéristique de la plante transformée ne lui confère aucun avantage sélectif si l'herbicide n'est pas appliqué. Or l'application de cet herbicide à large spectre n'est pas communément réalisée en dehors de l'environnement agricole et il n'est pas homologué en France pour des applications sur des cultures commerciales de céréales.

De nombreux essais ont montré que la plante transformée ne présente pas une capacité de survie modifiée par rapport aux plantes non transformées.

5. **Stabilité génétique de l'insert et stabilité phénotypique de la PSGM**

L'évènement de transformation T019H2 a été introgressé par croisements sexuels successifs dans des lignées parentales mâle et femelle d'un hybride commercial. Une fois l'introgression terminée, ces lignées ont été rendues homozygotes pour l'évènement de transformation T019H2 par autofécondations successives. Puis ces lignées ont été multipliées et croisées de façon à obtenir des semences hybrides. Au cours de ces croisements, cet évènement de transformation s'est comporté comme un caractère monogénique classique du point de vue des lois de Mendel.

Il a été choisi d'introgresser cet évènement de transformation dans un hybride présentant une mâle stérilité cytoplasmique, c'est-à-dire que les plantes hybrides transgéniques ne produisent pas de pollen. Enfin ces semences hybrides ont été semées et croisées avec des plantes hybrides non transgéniques pour produire la biomasse. Treize générations de plantes ont été produites depuis l'obtention de l'évènement de transformation primaire, jusqu'aux lots de biomasse utilisés actuellement.

Les analyses Southern blot ne montrent pas de différence de profil de l'insert entre la plante de première génération (T1) et des plantes de génération T 13.

Par ailleurs la quantité de lipase présente dans les graines reste sensiblement constante au travers des générations (de l'ordre de 1 mg de protéine recombinante par gramme de grains secs et propres).

Les tests en serre montrent que la protéine PAT est toujours exprimée et active.

Jusqu'à présent nous avons observé une bonne stabilité de l'insert, de l'expression de la lipase gastrique et de la protéine PAT.

6. **Toute Modification de la capacité de la PSGM à transférer du matériel génétique dans d'autres organismes**

Transfert horizontal (Transfert de matériel génétique depuis la PSGM vers microorganisme) :

Dans le cas de cet évènement de transformation, seules les séquences d'ADN situées entre deux régions particulières, bordures droite et gauche, ont été transférées au noyau de la cellule végétale.

Ces séquences contiennent le gène de l'enzyme PAT et le gène de la lipase gastrique. Or ces deux gènes sont déjà naturellement présents dans la nature : l'enzyme PAT est présente naturellement dans le sol, le gène utilisé ayant été isolé d'une bactérie du sol et la lipase gastrique est sécrétée dans l'estomac de tous les mammifères.

En outre, si un transfert horizontal avait lieu, ce qui à notre connaissance n'a jamais été montré en conditions naturelles, le promoteur utilisé ne permettrait pas a priori une expression de la lipase chez les bactéries (Cf. paragraphe C.2).

De plus, « Il a été estimé que les publications scientifiques les plus sérieuses et les avis de nombreux experts indépendants de l'O.C.D.E., de l'O.M.S. ou de l'Union européenne ont fait apparaître les faits suivants :

- Aucun transfert horizontal de gènes depuis les végétaux vers les bactéries n'a été jusqu'ici documenté dans la nature d'après l'ensemble de la bibliographie des travaux publiés : (1) impossibilité de mettre en évidence des gènes de résistance transférés aux bactéries du sol à partir de cultures de plantes transgéniques ; (2) impossibilité de mettre en évidence un transfert dans le sol en ajoutant des bactéries hyper-transformables dans le sol et de l'A.D.N. de gènes de résistance ;
- Le transfert horizontal de gène de résistance depuis les végétaux vers les bactéries est théoriquement possible avec une probabilité très faible et il existe quelques suggestions indirectes que de tels transferts puissent survenir. Dans les conditions optimales de laboratoire, la fréquence de transfert peut être estimée à environ 1 bactérie receveuse sur 10^{15} à 10^{18} , c'est-à-dire une probabilité quasi nulle, à quoi il faut ajouter que les gènes de résistance associés à des plantes transgéniques ne représentent dans le cas du maïs que 1 gène sur 40 000, soit 1/40 000ème d'A.D.N. ;
- Même si le transfert d'un gène de résistance d'une plante à une bactérie du sol survenait, la très faible pression de sélection du sol ou chez l'homme en bonne santé fait que cette bactérie n'a aucune chance d'être sélectionnée et de propager ainsi son gène de façon horizontale à d'autres bactéries. »

(Source : http://www.assemblee-nat.fr/rap-oecst/ogm_rap02.asp#A, extrait du rapport sur la connaissance des gènes à leur utilisation – Juin 1998).

Transfert interspécifique ou intergénérique (Transfert de matériel génétique depuis la PSGM vers une autre espèce sexuellement compatible autre que le maïs) :

Ces types de transferts ne sont pas possibles dans le cas du maïs en France car aucun genre ou espèce ne peut être fécondé par le pollen de maïs, à l'exception, très rare, de plantes des genres *Tripsacum* et *Téosite* or ces plantes d'espèces voisines ou apparentées, originaire d'Amérique centrale, ne se développent pas spontanément sur le territoire français (Cf. paragraphe B.2.b).

Transfert intraspécifique (Transfert de matériel génétique depuis la PSGM vers une plante de maïs non transformée) :

Ce cas de transfert est possible dans des champs contigus ou très proches étant donné que la présence de l'insert ne modifie pas les capacités de reproduction ni les modes de dissémination et en particulier par le pollen (Cf. paragraphe D.4). Néanmoins, ce type de problème peut être résolu par l'adoption à minima de méthodes culturales adéquates, à l'instar des règles utilisées pour la production de semences.

D'autres méthodes, telles que la présence de pièges à pollen (rangs de bordure), la castration, l'utilisation de lignées mâles stériles non productrices de pollen transgénique, l'ensachage des panicules, peuvent être utilisées afin de réduire au maximum les risques de transfert intraspécifique.

Dans le cadre des essais faisant l'objet de cette demande d'autorisation, les méthodes utilisées seront :

- une distance d'isolement d'au moins 400 m pour les parcelles de production de semences et de 200 m pour les productions de biomasse (plantes transgéniques non productrices de pollen),
- l'utilisation d'un système de stérilité mâle cytoplasmique ou d'une castration pour les plantes hybrides produisant la biomasse,
- la mise en place d'au moins 4 rangs de bordure.

La stérilité mâle cytoplasmique est une des techniques utilisées pour la production de semences hybrides de maïs : la lignée femelle, non productrice de pollen est fécondée par la lignée mâle et, à maturité, les semences hybrides sont récoltées sur les pieds femelles (Cf. schéma en introduction). Les stérilités mâles cytoplasmiques ont, par définition, une hérédité maternelle. Elles trouvent leur origine dans des mutations de l'ADN mitochondrial. Parmi les différents types de stérilité cytoplasmique existant chez le maïs, la « c » a été utilisée pour ce projet.

Pour pouvoir multiplier les lignées mâles stériles, non productrices de pollen, il est nécessaire de disposer de lignées isogéniques, ayant le même patrimoine génétique nucléaire, mais dont les mitochondries ne présentent pas de mutation conférant une stérilité mâle. En récoltant les semences produites par fécondation croisée sur les pieds mâles stériles, on parvient à multiplier ces lignées ne produisant pas de pollen.

Il faut veiller à ce que les lignées utilisées pour féconder les plantes ne produisant pas de pollen, soient mainteneuses de stérilité, c'est-à-dire qu'elles ne possèdent pas de gène nucléaire de restauration de la fertilité.

Avant toute dissémination la stérilité des lots de semences hybrides est testée à petite échelle en milieu confiné.

En ce qui concerne la production de biomasse, la mesure d'isolement mise en œuvre est destinée à éviter l'entrée de pollens dans la parcelle, comme il est pratiqué pour la production de semences traditionnelles (Cf. paragraphe B.4.a), et non la sortie de pollen transgénique puisque les plantes transgéniques sont mâles stériles. En effet, il est nécessaire pour la traçabilité de la production du principe actif d'éviter les fécondations croisées avec des maïs extérieurs à la parcelle.

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

Dans le cadre des essais déjà réalisés, aucune anomalie particulière n'a été relevée par le personnel en charge des cultures. Le personnel n'a pas eu non plus de problèmes de santé (allergies ou autres) pouvant avoir un lien avec la manipulation de ce maïs.

L'enzyme PAT est très spécifique aux substrats. Les acétyl-transférases sont très présentes dans la nature et ont une très faible stabilité protéolytique et thermique. Une étude de toxicité orale, menée pendant 14 jours, n'a révélé aucune indication de toxicité de la protéine PAT ingérée par des souris à des concentrations pouvant atteindre environ 5000 mg/kg de poids corporel (*Source : Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confere tolerance to phosphinothricin herbicide - ENV/JM/MONO(99)13 – Juin 99 – OECD*).

Les essais en champs réalisés depuis 1997 avec la même séquence codante pour une lipase gastrique à travers différents événements de transformation, ont permis de réaliser des essais de

toxicologie, de pharmacodynamie ainsi que des essais cliniques phase I et IIa. Ces études réglementaires sont conduites dans le but d'obtenir à terme une autorisation de mise sur le marché (AMM) de la lipase gastrique.

Plusieurs études de toxicité ont été réalisées avec des doses uniques ou répétées de cette lipase :

- Des rats ont reçu par voie orale, tous les jours pendant 4 semaines, jusqu'à 0.5 g de lipase / kg de poids corporel ; soit la quantité de lipase contenue dans une demi fois leur poids en maïs, tous les jours pendant 4 semaines.

- Des rats ont reçu par voie orale, en dose unique, jusqu'à 5 g de lipase / kg de poids corporel ; soit la quantité de lipase contenue dans cinq fois leur poids en maïs.

- D'autres essais de toxicité ont été menés avec des mini-porcs, des chiens et des singes.

Dans aucun cas, quelque soit la dose utilisée il n'a été constaté de toxicité.

En ce qui concerne les essais de pharmacodynamie et les premières phases d'essais cliniques, plus de soixante patients volontaires (sains ou atteints d'insuffisance pancréatique exocrine) ont été traités par voie orale avec de la lipase gastrique recombinante. Certains sujets ont été traités avec des doses de lipase équivalent à 3 kg de maïs (dose unique), d'autres ont reçu l'équivalent de 900 g de maïs par jour pendant 10 jours. Aucun effet indésirable sévère n'a été détecté.

8. Information concernant la sécurité de la PSGM pour la santé des animaux notamment en ce qui concerne tout effet toxique, allergisant ou autre effet nocif résultant de la modification génétique, lorsque la PSGM est destinée à être utilisée dans l'alimentation des animaux

Non applicable dans ce dossier. La PSGM n'est pas destinée à être utilisée dans l'alimentation des animaux.

9. Mécanisme d'interaction entre la plante génétiquement modifiée et les organismes cibles (le cas échéant)

Non applicable dans ce dossier.

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

Aucune interaction particulière n'est attendue avec les organismes non cibles.

La protéine PAT n'est pas connue pour présenter de toxicité.

La lipase gastrique exprimée n'a, a priori, aucune raison d'entraîner des modifications d'interaction avec les organismes non cibles. Les diverses études de toxicité aiguë à partir des extraits obtenus sur des plantes transformées (jusqu'à plusieurs grammes de lipase recombinante purifiée par kg d'animal), n'ont montré aucune toxicité. Il faudrait qu'un animal consomme plusieurs fois son poids en maïs pour atteindre les doses testées (sans toxicité observée). Cette hypothèse étant peu probable, il y a donc peu d'interactions potentielles avec les organismes non cibles.

De plus, au cours des nombreux essais déjà réalisés, il n'y a pas eu d'anomalie particulière relevée par le personnel en charge des cultures qui est vigilant sur la faune et la flore à proximité de chaque site.

11. Interactions potentielles avec l'environnement abiotique

Aucun effet négatif n'est attendu sur l'environnement abiotique des sites d'essais. Les essais seront menés comme n'importe quelle culture de maïs non génétiquement modifié. Les techniques culturales utilisées seront également les mêmes que pour du maïs commun. La protéine PAT est une enzyme issue d'une bactérie commune des sols. La lipase gastrique est une enzyme active à pH très acide à des températures de 35-40°C. Par conséquent aucune interaction potentielle avec l'environnement abiotique n'est attendue.

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

L'événement T019H2 est facilement détectable par de nombreuses techniques :

Techniques basées sur l'ADN :

Ces techniques basées sur l'ADN et non sur l'expression des protéines peuvent être réalisées à partir de toutes les cellules somatiques de la plante puisqu'elles ont le même patrimoine génétique (Bien que portées par la plante, les graines sont issues d'une fécondation et peuvent ne pas avoir le même patrimoine génétique). Pour des raisons techniques, ces analyses sont le plus souvent réalisées à partir de feuilles.

- Le « Southern blot » : Cette technique d'analyse moléculaire, permet d'identifier spécifiquement par l'hybridation d'une sonde la présence de chaque fragment de l'insert et leur taille respective. Elle permet d'identifier l'événement de transformation.
- *La PCR (Polymerase Chain Reaction)* : Cette technique de biologie moléculaire permet également l'identification des gènes introduits. Elle est basée sur l'amplification de l'ADN suite à des réactions de polymérisation en chaîne à partir de séquences spécifiques. Selon les séquences choisies on pourra détecter le gène d'intérêt et/ou le gène marqueur. Cette technique peut être utilisée pour avoir une information qualitative (présence ou non) ou quantitative.

Techniques basées sur l'expression des protéines :

Expression de la lipase gastrique :

- Ce sont les techniques classiques de laboratoires pour l'analyse des protéines qui sont basées soit sur la structure (Western blot, ELISA, ...), soit sur l'activité enzymatique (dosage par titrimétrie tel que décrit dans le paragraphe D.3.a). Ces analyses doivent être réalisées à partir de grains puisque c'est là que la lipase est exprimée. Le grain ne doit pas avoir été porté à des températures élevées, telles que celles utilisées habituellement pour le séchage ou la cuisson du maïs, car cela entraîne l'inactivation de la lipase qui, comme beaucoup de protéines, commence à être dégradée dès que l'on dépasse 50°C. Ces techniques sont spécifiques de la lipase gastrique produite, et donc de la séquence codante insérée dans le génome de la plante, mais pas d'un événement de transformation.

Expression de la protéine PAT :

Ces techniques permettent de détecter l'évènement de transformation T019H2 puisqu'il contient un gène codant pour une protéine PAT, mais ne sont pas spécifiques de cet évènement de transformation.

- Le « *Leaf painting assay* » : Les plantes transgéniques utilisées sont tolérantes au glufosinate ammonium, principe actif d'un herbicide, c'est-à-dire qu'elles ne meurent pas au contact d'un tel herbicide. Un test qualitatif de tolérance à l'herbicide permet donc de détecter ces plantes transgéniques :

- Si les cellules de la plante meurent au contact du glufosinate ammonium, cela signifie que la plante ne produit pas de PAT.
- Si les cellules de la plante ne meurent pas au contact du glufosinate ammonium, cela signifie que la plante produit la PAT.

Le test est réalisé en appliquant localement en bout de feuille avec un pinceau imbibé, une solution herbicide de glufosinate ammonium. Au bout de quelques jours, une simple observation visuelle permet de conclure :



Résultat négatif : La feuille est sèche, jaunie et racornie. La plante n'est pas tolérante.



Résultat positif : La feuille n'a aucune trace. La plante est tolérante.

- Le « *Strip test* » : Cette technique, basée sur une réaction immuno-enzymatique, permet également la détection de la PAT. Des bandelettes imprégnées d'anticorps spécifiquement dirigés contre la PAT et couplés à un agent coloré permettent de mettre en évidence la présence de la PAT par une simple observation visuelle d'une bandelette mise à tremper quelques minutes dans un broyat d'un fragment de feuille ou de grain(s). L'avantage est que la méthode peut être utilisée au champ et que le résultat est obtenu rapidement.

13. Information, le cas échéant, sur les précédentes disséminations de la plante génétiquement modifiée

De nombreux essais ont déjà été réalisés avec l'évènement de transformation faisant l'objet de ce dossier. Ces essais (production de semences et de biomasse) ont été réalisés en France et à l'étranger durant les années 2000, 2001, 2002 et 2003 sur des parcelles allant de quelques centaines de m² à une dizaine d'hectares.

Sur l'ensemble des essais, le personnel en charge des cultures, le personnel sous-traitant, le personnel de MERISTEM® et le personnel du service de la Protection des Végétaux (chargé d'effectuer le contrôle sur le respect des règles de dissémination) n'ont pas noté d'anomalie particulière sur le comportement des PSGM imputable aux transgènes.

L'ensemble de ces essais s'est bien déroulé.

E. INFORMATIONS CONCERNANT LE SITE DE DISSEMINATION

1. Localisation et étendue des sites de dissémination

Pour des raisons d'organisation, les sites exacts de dissémination n'ont pas encore été totalement retenus.

Programme d'expérimentation pour l'année 2005 :

ESSAI	LOCALISATION	SURFACE MAXIMALE EN m ² (RANGS DE BORDURE INCLUS)
N°1 : Production de biomasse surface totale sur 2 à 3 sites	Limagne	200 000 m ²
N°2 : Production de semences hybrides	Limagne	5 000 m ²
N°3 : Production de semences de base femelles	Limagne	3000 m ²
N°4 : Production de semences de base mâles	Limagne	3000 m ²

Remarque : Pour les productions de biomasse, 1/4 ou 1/5 (selon si le dispositif de semis est un 6/2, 6 rangs de plantes utilisées comme femelles pour 2 rangs de plantes utilisées comme mâles, ou un 8/2) de la surface de l'essai, hormis les rangs de bordure, est occupé par des plantes mâles non transgéniques ayant le rôle de pollinisateur.

Pour les productions de semences hybrides et de semences de base femelles, seulement 50% à 30% (selon que le dispositif de semis est 1/1 ou 1/2) de la surface de l'essai, hors bordures non transgéniques, est occupée par des plantes transgéniques mâles fertiles.

L'implantation des sites sera communiquée ultérieurement.

2. Description de l'écosystème des sites de dissémination, y compris le climat, la flore et la faune

Les parcelles concernées par ces essais sont toutes dédiées et adaptées à la polyculture (blé, tournesol, pois, maïs, sorgho...). Les interactions avec la flore sauvage sont donc très limitées puisque les parcelles sont désherbées.

La faune des régions d'implantation des essais n'a pas de caractéristique particulière. La faune concernée étant pour l'essentiel des animaux sauvages tels que les sangliers ou les chevreuils, les oiseaux et les insectes.

Le climat en Auvergne est plus particulièrement dans le Puy de Dôme est caractérisé par des étés chauds et secs avec des périodes orageuses pouvant être accompagnées de grêle et des hivers très froids. Selon les années, les premières gelées apparaissent courant octobre.

Les parcelles seront définitivement choisies, au plus tard lors de la présentation du dossier devant la CGB.

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

Il n'y a pas d'espèces végétales sauvages apparentées sexuellement compatibles poussant spontanément sur le territoire français (Cf. paragraphe B.2.b). De ce fait, les seules plantes sexuellement compatibles sont les autres plantes de maïs cultivées. Ces cultures de maïs seront en dehors de la distance d'isolement requise pour ces essais et toutes les précautions prises (Cf. paragraphe D.6) permettent d'éviter les éventuels croisements intraspécifiques.

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

Les parcelles concernées par ces essais sont toutes dédiées et adaptées à la polyculture. Lorsque les sites seront connus, leur proximité avec des biotopes officiellement reconnus ou des zones protégées sera étudiée.

F. INFORMATIONS CONCERNANT LA DISSEMINATION

1. Objectif de la dissémination

Les études prévisionnelles de marché montrent un besoin d'environ une tonne de lipase gastrique recombinante par an, soit environ 5000 tonnes de maïs à produire au champ chaque année, ce qui devrait correspondre à une surface de maïs cultivée d'environ 1000 hectares. Les productions en plein champ sont donc indispensables si l'on veut disposer d'un produit à un coût compétitif pour les patients et le système de santé. Les biomasses produites au cours de ces différents essais permettront également d'acquérir des données sur la fiabilité du système de production et la reproductibilité de la qualité du principe actif extrait et purifié.

Tous ces essais sont réalisés à des fins de recherche et de développement. Les produits de récolte ne seront pas destinés à l'alimentation humaine ou animale.

Les objectifs de cette demande de renouvellement d'autorisation de dissémination sont de :

- Produire des grains de maïs (biomasse) exprimant la lipase gastrique pour :
 - Terminer l'ensemble des tests cliniques nécessaires à l'obtention de l'AMM avec la lipase recombinante purifiée produite,
 - Réaliser les études galéniques,
 - Tester le procédé d'extraction / purification à une échelle quart de grand,
 - Développer de nouveaux hybrides de maïs pour pouvoir diversifier les zones de culture possibles,
 - Optimiser nos travaux sur la mise en place d'une filière dédiée compatible avec les exigences réglementaires applicables à la production de principes actifs à usages thérapeutiques.
- Produire des graines de maïs (semence) exprimant la lipase gastrique pour :
 - Continuer les productions de biomasse,

- Poursuivre les introgressions dans deux nouvelles lignées par sélection au champ,
- Développer deux nouveaux hybrides pour pouvoir diversifier les zones de production.

En conséquence :

- Les quantités de protéines recombinantes à extraire, nécessaires pour atteindre les objectifs cités, nécessitent des surfaces d'environ 200 000 m² en 2005 (production de biomasse). Si les résultats expérimentaux sont satisfaisants, il est envisagé de réaliser des cultures progressivement sur environ 20 à 100 ha pour les années suivantes (2006, 2007 et 2008).
- Les surfaces de culture des essais de production de semences sont de tailles bien plus réduites par rapport aux essais de production de biomasse (de l'ordre de l'hectare dont 30 à 50 % des plantes, selon le dispositif de semis, sont productrices de pollen).

2. Date(s) et durée prévues de l'opération

Pour l'année 2005, la période de dissémination s'étalera au plus d'Avril à Octobre, soit 7 mois. Les dates exactes de semis ne seront déterminées que quelques jours avant pour des raisons d'organisation, de disponibilité de matériel et des conditions climatiques.

Le broyage des résidus de culture aura lieu dans les semaines suivant la récolte. La surveillance des repousses sera réalisée pendant un an après la récolte, c'est-à-dire jusqu'en octobre 2006.

Pour les années 2006, 2007 et 2008, les plannings des opérations seront similaires.

Les dates et la durée sont indicatives et peuvent être modifiées en fonction des conditions climatiques.

3. Méthode de dissémination envisagée

Les essais seront réalisés comme des cultures de maïs traditionnel. Les seules différences sont les précautions mises en œuvre pour éviter tout croisement intraspécifique.

La dissémination se fera par un semis manuel (canne à semer) ou mécaniquement (semoir) selon la taille de la parcelle et le type de production (semences ou biomasse).

Le semis, pour les essais de production de biomasse, sera réalisé avec une alternance de pieds transgéniques mâles stériles utilisés comme femelles et de pieds hybrides non transgéniques utilisés comme mâles (rôle de pollinisateur).

Le semis, pour les essais de production de semences hybrides, sera réalisé avec une alternance de pieds transgéniques mâles stériles utilisés comme femelles et de pieds transgéniques utilisés comme mâles.

Le semis, pour les essais de production de semences de base, sera réalisé avec une alternance de pieds transgéniques utilisés comme femelles et de pieds transgéniques utilisés comme mâles ou bien sera fait en épi lignes.

Chaque essai sera entouré d'au moins 4 rangs de bordure (maïs non transgéniques stériles ou castrés pour la production de semences, ou maïs non transgénique fertile pour la production de biomasse). Ces rangs de bordure pourront présenter une chicane ou une ouverture en biais nécessaire aux

passages des machines agricoles. Leur rôle premier étant de constituer une barrière contre le passage du pollen, les rangs de bordure ne seront détruits qu'une fois la floraison mâle complètement terminée.

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

- La préparation des parcelles se fera en fonction du type de sol et des conditions climatiques de l'année par passage des outils appropriés. En fonction des besoins, il sera également appliqué un fertilisant et un désherbant avant la culture.
- Les semis seront réalisés manuellement ou mécaniquement selon le cas (Cf. paragraphe F.3).
- Après le semis, le sol sera travaillé si nécessaire par les techniques agricoles habituelles (binage, buttage...).
- Si nécessaire, différents traitements phytosanitaires ou de lutte biologique (trichogrammes par exemple) seront effectués pendant la culture afin de la protéger des ravageurs : insecticides, pesticides, fongicides.
- Les parcelles seront irriguées.
- Une élimination des petits pieds, talles et hors type pourra s'avérer nécessaire.
- La période de floraison sera déterminée pour effectuer les croisements contrôlés sur les parcelles de sélection de semences, pour contrôler la stérilité mâle sur les essais de production de biomasse et de semence de base femelle et pour réaliser d'éventuelles castrations.
- Les rangs de bordure seront broyés une fois la pollinisation terminée.
- Les pieds mâles non transgéniques utilisés dans les essais de production de biomasse seront soit éliminés soit menés à terme et conservés pour des analyses (ces plantes seront assimilées à des plantes transgéniques par rapport aux contraintes d'utilisation).
- Des prélèvements de parties de plantes ou d'épis pourront être effectués tout au long des cultures pour réaliser des analyses.
- La récolte sera réalisée en épi manuellement ou à l'aide d'un corn-picker ou en grain avec une moissonneuse-batteuse : ceci en fonction du stade de maturité du grain et des volumes nécessaires et du type de production (semence ou biomasse). Les résidus de culture seront broyés. Si les conditions d'érosion du sol le permettent, un enfouissement pourra être réalisé.
- Les produits de récolte seront transportés de manière sécurisée dans un site agréé par la Commission du Génie Génétique (CGG).
- L'année suivant la culture, il ne sera pas planté de maïs commercial et chaque parcelle sera surveillée pour éliminer toute repousse avant quelle atteigne le stade floraison. Cette surveillance sera réalisée pendant un an après la récolte.
- L'ensemble des actions est réalisé selon un cahier des charges rigoureux permettant d'assurer la traçabilité.

Tout au long des essais, des visites régulières seront effectuées pour contrôler le site et noter d'éventuelles anomalies. Les inspecteurs du service de la Protection des Végétaux viendront également contrôler le respect des consignes de dissémination.

5. Nombre approximatif de plantes (ou de plante par mètre carré)

Selon le type d'essai (production de semences ou de biomasse) la densité peut varier d'environ 60 000 à 100 000 pieds par hectare soit 6 à 10 pieds par m².

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

1. Précautions prises

a) Distance(s) des autres espèces végétales sexuellement compatibles, espèces parentales et cultivées

Il n'y a pas d'espèce végétale sauvage apparentée sexuellement compatible poussant spontanément sur le territoire français (Cf. paragraphe B.2.b). De ce fait, les seules plantes sexuellement compatibles sont les autres plantes de maïs cultivées. Ces cultures de maïs seront au delà de la distance d'isolement requise pour ces essais et toutes les précautions prises (Cf. paragraphe G.1.b) permettent d'éviter les éventuels croisements intraspécifiques.

Les parcelles sont isolées de 200 m, pour les cultures utilisant des plantes transgéniques mâles stériles ou castrées, et de 400 m pour les cultures utilisant des plantes transgéniques fertiles, vis-à-vis de toute culture commerciale de maïs.

b) Mesures visant à minimiser ou à empêcher la dissémination de tout organe reproducteur de la PSGM (par exemple pollen, graines, tubercules)

Pour le pollen, les mesures prises sont :

- Isolement de 400 m pour les parcelles de production de semences et de 200 m pour les productions de biomasse (maïs transgénique mâle stérile ou castré) par rapport à toute culture commerciale de maïs,
- Mise en place d'au moins 4 rangs de bordure de maïs non transgéniques autour des parcelles d'essai,
- Utilisation d'un système de stérilité mâle cytoplasmique pour les parcelles de production de biomasse.

Pour les graines, la dissémination est fortement minimisée naturellement par la physiologie de l'épi où de nombreuses spathes (prolongements foliaires) protègent les graines fortement insérées dans la rafle. Néanmoins, les mesures supplémentaires prises sont :

- Le broyage des résidus de culture,
- L'enfouissement des broyats si l'érosion du sol n'est pas altérée.

2. Description des méthodes de traitement du site après dissémination

L'ensemble des parcelles de maïs génétiquement modifié est récolté. A la fin des essais, les résidus de culture sont détruits par broyage à l'aide de matériel approprié (broyeur, rotavator, disques...). Si l'érosion du sol n'est pas altérée, un enfouissement des broyats sera réalisé.

Pendant un an après la récolte, une surveillance du site sera réalisée afin d'éliminer d'éventuelles repousses et ceci avant qu'elles puissent atteindre le stade floraison. Selon le cas, les éventuelles

repousses pourront être éliminées manuellement, mécaniquement ou par un herbicide différent du glufosinate ammonium.

Aucune culture commerciale de maïs ne sera implantée l'année qui suit la culture expérimentale.

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

Les grains ou épis récoltés seront transférés vers des sites agréés par la CGG. Ces produits de récolte seront travaillés selon les mêmes étapes que du maïs conventionnel (séchage, égrenage, nettoyage) avant d'être utilisés pour extraire et purifier la lipase recombinante. Les déchets générés par la récolte et l'égrenage (rafles essentiellement) seront laissés sur la parcelle de culture et broyés avec les autres résidus de culture.

Les déchets post-récolte générés ainsi que les grains éventuellement non utilisés seront incinérés (centre incinérateur classique ou cimenterie) ou broyés et enfouis en décharge de classe II.

4. Description des plans et des techniques de surveillance

Les expérimentations font l'objet d'une surveillance régulière dont la fréquence est adaptée au niveau du développement de la culture (et au moins 2 fois/mois). De nombreuses personnes sont impliquées dans ces essais et notamment pour la préparation, le semis, le suivi de la croissance, la pollinisation et le contrôle du respect des consignes de dissémination par les agents assermentés du service de la Protection des Végétaux. Les fréquences de passage sont plus soutenues aux étapes de culture les plus critiques à savoir : le semis, la floraison et la récolte.

Les distances d'isolement sont contrôlées à l'aide d'un GPS.

L'année suivant la récolte, une surveillance est effectuée sur la culture de la rotation afin de détruire les éventuelles repousses de maïs.

5. Description des plans d'urgence

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

Ainsi les essais peuvent être interrompus rapidement à tout moment par les moyens de destruction suivants :

- Chimique : Traitement avec un herbicide total conventionnel autre que le glufosinate ammonium.
- Mécanique : Récolte anticipée, fauchage, broyage, labour.

6. Méthodes et procédures de protection du site

Les essais implantés dans des zones, où les risques de destruction par des animaux sauvages (sangliers ou autres) sont non négligeables, peuvent éventuellement être protégés par une clôture électrifiée.

Aucune autre méthode ou procédure de protection de l'essai n'est utilisée.

H. CONCLUSIONS CONCERNANT LES INCIDENCES POTENTIELLES SUR L'ENVIRONNEMENT DE LA DISSÉMINATION DES PLANTES SUPÉRIEURES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉES (PSGM)

Ce paragraphe est un complément d'information à la notification conformément à l'annexe II D2 de la directive 2001/18/CE du parlement Européen et du conseil du 12 mars 2001 relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement et abrogeant la directive 90/220/CEE du conseil.

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

Les plantes concernées par ces essais expriment une lipase gastrique et la phosphinothricine acétyl-tranférase conférant une tolérance à un herbicide (le glufosinate ammonium).

La probabilité que les PSGM deviennent plus persistantes que les plantes réceptrices dans les habitats agricoles est extrêmement faible. A priori aucun avantage sélectif ne peut être conféré par l'expression de la lipase chez les maïs transgéniques. Aucune augmentation de la capacité de survie des PSGM n'a été observée au cours des nombreux et différents essais en champ. En ce qui concerne la tolérance au glufosinate ammonium, l'avantage sélectif ne peut pas être maintenu dans les habitats agricoles français. Tout d'abord, étant donné les précautions prises pour éviter tout croisement intraspécifique, la probabilité d'acquisition du caractère de tolérance au glufosinate ammonium est très faible. Ensuite, même si cette possibilité se réalisait, la ou les plantes concernées n'auraient aucun avantage de persistance sans pression de sélection. Le glufosinate ammonium n'est pas homologué en France sur les cultures commerciales de céréales donc la pression de sélection est inexistante.

La propagation des PSGM dans les habitats naturels est fortement improbable étant donné que :

- Le maïs est une plante tellement domestiquée par l'homme qu'il lui est quasiment impossible de pousser sans son intervention. Donc, son espace privilégié de développement reste de loin les espaces agricoles travaillés,
- La modification génétique, au vu des nombreux essais, n'influe pas sur l'augmentation de la capacité de survie et du pouvoir reproducteur,
- Le maïs est une plante graminée sub-tropicale annuelle originaire d'Amérique centrale et n'a pas d'habitat naturel en France. Les espèces les plus proches du maïs sont la téosinte, graminée sauvage d'Amérique centrale (Mexique essentiellement) et le genre apparenté *Tripsacum*. Les espèces voisines de *Zea* sont limitées sur le plan géographique et se trouvent au Mexique et au Guatemala. Seule la téosinte peut se croiser avec le maïs dans des conditions naturelles. Il n'y a donc pas d'hybridation interspécifique possible en France du fait de l'absence d'espèces voisines ou apparentées se développant spontanément sur le territoire français,
- Le maïs n'est pas connu pour être une plante invasive des habitats naturels,
- Les graines de maïs sont fortement insérées dans la rafle de l'épi et protégées par de nombreuses spathes ce qui limite fortement la dispersion des graines,
- Le maïs est une plante annuelle qui ne survit généralement pas en Europe d'une année sur l'autre à cause de la sensibilité des graines aux froids hivernaux,
- Le maïs est une plante sensible à de nombreuses maladies ce qui diminue encore sa probabilité à persister sans l'intervention de l'homme.

Le risque de persistance et de propagation dans les habitats agricoles et naturels est donc fortement improbable.

2. Avantages ou inconvénients sélectifs conférés aux PSGM

Les PSGM concernées dans cette notification ont été réalisées afin de produire et de stocker une lipase gastrique, qui est utilisée en tant que principe actif thérapeutique après extraction et purification. La machinerie cellulaire des plantes est utilisée pour produire dans les graines une lipase gastrique en plus de ses propres protéines. La modification génétique n'a donc pas été réalisée pour conférer un avantage ou un inconvénient sélectif quelconque à la plante réceptrice, le maïs. D'ailleurs, aucun comportement particulier des graines d'une génération à l'autre n'a été observé. Leurs caractéristiques (faculté germinative, résistance aux maladies...) n'est pas différente par rapport aux graines de même variété non transgéniques.

L'insertion du gène bar conférant la tolérance au glufosinate ammonium a pour objectif de repérer facilement et rapidement les plantes transformées. Cette tolérance ne confère aucun avantage sélectif pour les raisons énoncées au point 1 de ce paragraphe, d'autant plus que dans l'habitat naturel, les pressions de sélection qui pourraient être induites par le glufosinate ammonium sont inexistantes.

3. Possibilité de transfert de gènes aux mêmes espèces ou à d'autres espèces végétales sexuellement compatibles dans des conditions de plantation de la PSGM et avantages ou inconvénients sélectifs conférés à ces espèces végétales

Comme il a été énoncé dans le point 1 de ce paragraphe, le maïs est une plante graminée subtropicale annuelle originaire d'Amérique centrale et n'a pas d'habitat naturel en France. Les espèces les plus proches du maïs sont la Téosinte, graminée sauvage d'Amérique centrale (Mexique essentiellement) et le genre apparenté *Tripsacum*. Les espèces voisines de *Zea* sont limitées sur le plan géographique et se trouvent au Mexique et au Guatemala. Seule la Téosinte peut se croiser avec le maïs dans des conditions naturelles. Il n'y a donc pas d'hybridation interspécifique possible en France du fait de l'absence d'espèces voisines ou apparentées se développant spontanément sur le territoire français.

Les transferts de gènes intraspécifiques, c'est-à-dire de la PSGM vers un maïs cultivé conventionnel, sont possibles dans des champs contigus ou très proches étant donné que la présence de l'insert ne modifie pas les capacités de reproduction ni les modes de dissémination, en particulier par le pollen. Néanmoins, ce type de croisement reste peu probable du fait :

- Que le maïs n'est pas présent spontanément dans les habitats naturels. Son implantation est contrôlée par l'homme et limitée à des zones telles que les champs ou les jardins,
- De l'adoption de méthodes culturales adéquates. L'ensemble des précautions prises et cumulées permet de diminuer fortement la probabilité de transferts de gènes que ce soit par l'intermédiaire du pollen ou des graines.

Dans le cadre des essais faisant l'objet de cette demande d'autorisation, les méthodes utilisées seront :

- Un isolement de 400 m pour les parcelles de production de semences et de 200 m pour les productions de biomasse (maïs transgénique mâle stérile ou castré) par rapport à toute culture commerciale de maïs,

- La mise en place d'au moins 4 rangs de bordure de maïs non transgéniques autour des parcelles d'essai,
- L'utilisation d'un système de stérilité mâle cytoplasmique pour les parcelles de production de biomasse.

Le risque de transfert de gènes est donc extrêmement faible.

Dans tous les cas, et pour les raisons énoncées au point 2 de ce paragraphe, aucun avantage ou inconvénient sélectif n'est attendu dans les plantes concernées.

4. Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les PSGM et les organismes cibles, tels que prédateurs, parasitoïdes et agents pathogènes peuvent avoir sur l'environnement (le cas échéant)

Les PSGM faisant l'objet de ce dossier n'ont pas pour objectif une interaction directe avec des organismes cibles tels que prédateurs, parasitoïdes, et agents pathogènes.

Les interactions indirectes entre les PSGM et ces organismes peuvent avoir lieu lorsque ces derniers attaquent les plantes. Dans ce cas, aucune incidence immédiate ou différée n'est attendue et n'a été observée au cours des différents essais en champ conduits depuis plusieurs années. La lipase gastrique et la protéine PAT (Phosphinothricine acétyl-transferase) ne sont naturellement pas des enzymes ayant pour vocation un rôle toxique : l'une hydrolyse *in vivo* les triglycérides à chaîne longue, l'autre a un rôle dans une voie de biosynthèse et d'autodéfense (*Kumada Y - J Antibiot (Tokyo). 1988 Dec;41(12):1838-45*).

Les études sur la PAT sont nombreuses et montrent qu'elle n'est pas une protéine toxique ou allergène pour les animaux et les êtres humains (*Source : Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confere tolerance to phosphinothricin herbicide - ENV/JM/MONO(99)13 – Juin 99 – OECD*). Ces études ont notamment été réalisées pour des produits génétiquement modifiés qui sont autorisés dans l'alimentation animale et humaine notamment aux Etats-Unis et au Canada.

Les études de toxicité de la lipase gastrique recombinante sur des animaux et les études pré-cliniques et cliniques phase I et IIa sur des volontaires sains et malades n'ont montré aucune toxicité.

Aucune anomalie particulière n'a été relevée lors des observations réalisées pendant les nombreux essais déjà réalisés par le personnel en charge des travaux et des suivis de culture.

5. Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les PSGM et les organismes non cibles (compte tenu également des interactions d'organismes avec les organismes cibles), notamment les incidences sur les niveaux de population des concurrents, herbivores, symbiotes (le cas échéant), parasites et agents pathogènes

Les interactions directes entre les PSGM et les organismes non cibles peuvent avoir lieu lorsque ces derniers attaquent les plantes. Aucune incidence immédiate ou différée sur les niveaux de population des concurrents, herbivores, symbiotes, parasites et agents pathogènes n'est attendue et n'a été observée au cours des différents essais en champ conduits depuis plusieurs années.

De plus, les interactions avec des organismes non cibles, notamment les parasites et pathogènes, sont limitées par les techniques agricoles classiques (traitements phytosanitaires, trichogrammes...). En ce qui concerne les herbivores, les interactions sont également limitées dans les zones riches en gibier (sanglier, cerf) par la pose éventuelle de clôtures électrifiées lorsqu'un risque important de destruction des cultures est attendu.

Les interactions avec les oiseaux sont limitées étant donné que ces derniers sont attirés par les graines qui, par la physiologie de l'épi, restent difficilement accessibles.

Aucune anomalie particulière n'a été relevée lors des observations réalisées pendant les nombreux essais déjà réalisés par le personnel en charge des travaux et des suivis de culture.

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

La manipulation des PSGM est quotidienne au sein de MERISTEM[®] Therapeutics. De nombreuses personnes entrent ou sont entrées en contact avec ces PSGM que ce soit en champ, en serre ou au laboratoire depuis de nombreuses années et à ce jour, aucune personne n'a mentionné un problème de santé lié à la manipulation de ces PSGM.

De nombreuses études ont été réalisées sur la PAT et ont montré qu'elle n'est pas une protéine toxique ou allergène. Il a été montré que cette enzyme non glycosylée est très spécifique de son substrat et n'influe pas sur le métabolisme de la plante. Si elle était ingérée non intentionnellement ou par des organismes non cibles (animaux sauvages par exemple), il a été montré qu'elle serait rapidement inactivée par dégradation enzymatique et protéolyse acide dans le système digestif. De plus, il a été montré que la PAT n'avait aucune séquence analogue significative avec des allergènes et toxines connues (*Source : Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confere tolerance to phosphinothricin herbicide - ENV/JM/MONO(99)13 – Juin 99 – OECD*). Aujourd'hui de nombreux produits génétiquement modifiés exprimant cette protéine sont autorisés dans l'alimentation animale et humaine notamment aux Etats-Unis et au Canada.

En ce qui concerne la lipase gastrique, les études de toxicité sur des animaux et les études pré-cliniques et cliniques n'ont montré aucune toxicité de la lipase gastrique. En effet, les études cliniques phase I, réalisées sur des volontaires sains (hommes et femmes non atteints par la maladie), ont permis de montrer une excellente tolérance de la lipase gastrique en administration orale unique et répétée. Les études cliniques phase IIa, réalisées sur des volontaires malades, ont permis de montrer une excellente tolérance de la lipase gastrique en administration orale et une amélioration significative de l'absorption des graisses. Certains sujets ont été traités avec des doses de lipase équivalent à 3 kg de maïs (dose unique), d'autres ont reçu l'équivalent de 900 g de maïs par jour pendant 10 jours. Aucun effet indésirable sévère n'a été détecté.

Les PSGM faisant l'objet de ce dossier ne sont pas destinées à l'alimentation humaine.

Pour ces raisons, aucun effet immédiat ou différé sur la santé humaine n'est attendu.

7. Effets immédiats et/ou différés éventuels sur la santé des animaux et conséquences pour la chaîne alimentaire résultant de la consommation de l'OGM et des organismes cibles et non cibles à proximité du ou des OGM disséminés

Les PSGM faisant l'objet de ce dossier ne sont pas destinées à l'alimentation animale. Néanmoins on ne peut pas exclure le fait que des animaux sauvages viennent consommer des petites quantités de ces PSGM. Dans ce cas, toutes les études et raisons énoncées notamment dans le point 6 de ce paragraphe s'appliquent pour la santé des animaux.

Plusieurs études de toxicité ont été réalisées avec des doses uniques ou répétées de cette lipase :

- Des rats ont reçu par voie orale, tous les jours pendant 4 semaines, jusqu'à 0.5 g de lipase / kg de poids corporel ; soit la quantité de lipase contenue dans une demi fois leur poids en maïs, tous les jours pendant 4 semaines.

- Des rats ont reçu par voie orale, en dose unique, jusqu'à 5 g de lipase / kg de poids corporel ; soit la quantité de lipase contenue dans cinq fois leur poids en maïs.

- D'autres essais de toxicité ont été menés avec des mini-porcs, des chiens et des singes.

Dans aucun cas, quelque soit la dose utilisée il n'a été constaté de toxicité.

De ce fait, aucun effet immédiat ou différé sur la santé des animaux ou sur la chaîne alimentaire n'est attendu.

8. Incidences immédiates et/ou différées sur les processus biogéochimiques résultant des interactions directes et indirectes potentielles de l'OGM et des organismes cibles et non cibles à proximité du ou des OGM disséminés

Plusieurs raisons tendent à démontrer qu'aucune incidence immédiate ou différée n'est attendue sur les processus biogéochimiques :

- Nous n'avons constaté aucun effet néfaste des PSGM sur les organismes non cibles,

- Les gènes ajoutés dans le maïs et le produit de ces gènes sont déjà naturellement présents dans l'environnement et ne posent aucun problème pour la santé et l'environnement. En effet, le gène bar codant pour la protéine PAT est issu de la bactérie *Streptomyces hygroscopicus* naturellement présente dans les sols. De même, la lipase gastrique est présente dans l'estomac de tous les mammifères. De plus, son activité enzymatique d'hydrolyse ne s'exerce que sur les triglycérides et dans des conditions très spécifiques (température d'environ 35 à 40°C, pH acide, conditions d'émulsion trouvées dans l'estomac).

- Les gènes introduits sont contrôlés par des promoteurs de plantes qui ne correspondent pas à ceux des microorganismes.

Les pratiques agricoles utilisées pour ces PSGM sont les mêmes que celles utilisées pour du maïs conventionnel non transgénique, ce qui, a priori, n'engendre ni plus ni moins d'effet néfaste sur le sol et les processus géochimiques.

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

Les techniques agricoles générales et de récolte utilisées pour ce maïs génétiquement modifié sont les mêmes que celles utilisées pour la production de maïs conventionnel consommation ou de semences hybrides.

Les spécificités des pratiques sont dues aux précautions prises pour éviter tout risque de dissémination, que ce soit des graines ou du pollen.

Un diagramme synoptique page suivante, présente les principales étapes de la culture des PSGM.

