

SOCIETE BIOGEMMA

Demande d'autorisation auprès du Ministère de l'Agriculture

**Essai au champ de maïs destinés à valider la fonction d'un gène de
tolérance au stress hydrique
Dossier B/FR/05.02.02**

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

PREAMBULE

Cette demande d'expérimentation est déposée dans le cadre de la réglementation européenne décrite dans la directive 90/220/CEE, transposée en droit français par la loi du 13 juillet 1992. Cette directive a été modifiée le 17 avril 2001 par la directive 2001/18/CE.

Ces textes régissent la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés, que ce soit à des fins de mise en marché ou à d'autres fins et notamment à des fins de recherche.

La demande qui fait l'objet de ce dossier concerne un essai dont les résultats attendus doivent permettre de valider une hypothèse (« preuve de concept »). Il s'agit d'un premier essai en champ en France pour ces événements de transformation ; il fait suite à différentes expérimentations en serre.

Conformément à la directive 2001/18, l'importance de la dissémination et les conditions de son déroulement prennent en compte le stade de développement du projet et l'information scientifique disponible. S'agissant d'un projet nouveau, les plantes ont été caractérisées par des études moléculaires ; la stabilité d'expression des caractères introduits dans les plantes a été observée durant plusieurs générations en serre.

SOMMAIRE

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

E. Informations concernant le site de dissémination	16
E.1 Localisation et étendue des sites de dissémination	16
E.2 Description de l'écosystème des sites de dissémination	16
E.3 Présence d'espèces apparentées sauvages sexuellement compatibles ou d'espèces végétales cultivées sexuellement compatibles	16
E.4 Proximité des sites de biotopes officiellement reconnus ou de zones protégées susceptibles d'être affectées	17
F. Information concernant la dissémination	17
F.1 Objectif de la dissémination	17
F.2 Date et durée prévues de l'opération	17
F.3 Méthode de dissémination envisagée	17
F.4 Méthode de préparation et gestion du site avant, pendant et après la dissémination, y compris les pratiques culturales et méthodes de récolte	17
F.5 Nombre approximatif de plantes	18
G. Information sur les plans de surveillance, de contrôle et de traitement du site et des déchets après dissémination	18
G.1 Précautions prises	18
G.2 Description des méthodes de traitement du site après dissémination	18
G.3 Description des méthodes de traitement après dissémination pour le matériel issu de plantes génétiquement modifiées, y compris les déchets	19
G.4 Description des plans et techniques de surveillance	19
G.5 Description des plans d'urgence	19
G.6 Méthodes et procédures de protection du site	19

Annexe II. D2

Conclusions concernant les incidences potentielles sur l'environnement de la dissémination

1. Probabilité que les plantes modifiées deviennent plus persistantes que les plantes parentales ou réceptrices dans les habitats agricoles ou se propagent plus rapidement dans les habitats naturels	20
2. Avantages ou inconvénients sélectifs conférés aux plantes modifiées	20
3. Possibilité de transfert de gènes aux mêmes espèces ou à d'autres espèces végétales sexuellement compatibles dans les conditions de plantation des plantes modifiées et avantages ou inconvénients sélectifs conférés à ces espèces végétales	20
4. Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les plantes modifiées et les organismes cibles, tels que prédateurs, parasitoïdes et agents pathogènes peuvent avoir sur l'environnement	21
5. Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les plantes modifiées et des organismes non-cibles, notamment les incidences sur les niveaux de population des concurrents, herbivores, symbiotes, parasites et agents pathogènes	21

6. Effets immédiats et/ou différés éventuels sur la santé humaine résultant des interactions directes ou indirectes potentielles entre les plantes modifiées et les personnes travaillant ou entrant en contact avec la ou les plantes modifiées disséminées ou se trouvant à proximité	21
7. Effets immédiats et/ou différés éventuels sur la santé des animaux et conséquences pour la chaîne alimentaire résultant de la consommation de la plante modifiée ou de tout produit dérivé s'il est destiné à être utilisé en tant qu'aliment pour animaux	22
8. Incidences immédiates et/ou différées sur les processus biogéochimiques résultant des interactions directes et indirectes potentielles de la plante modifiée et des organismes cibles et non-cibles à proximité du ou des OGM disséminés	22
9. Incidences immédiates et/ou différées, directes ou indirectes, que les techniques spécifiques de culture, de gestion et de récolte utilisées pour les plantes modifiées peuvent avoir sur l'environnement lorsqu'elles sont différentes de celles utilisées pour des plantes supérieures non génétiquement modifiées	22

INTRODUCTION

L'eau est indispensable à la vie de la plante où elle remplit de nombreux rôles:

- solvant du milieu cellulaire,
- soutien de la plante par la pression qu'elle exerce sur les parois cellulaires,
- déclencheur, de façon mécanique, du mouvement de certains organes (ouverture des feuilles, etc...),
- véhicule des substances nutritives ainsi que des molécules-sigaux (et notamment des hormones),
- co-substrat du processus de photosynthèse,
- etc.

De ce fait, la disponibilité de l'eau pour la croissance des plantes est un facteur limitant important. Dans les régions sèches, elle constitue la principale entrave à la croissance et au développement des plantes. Dans les zones tempérées, des périodes de sécheresse inattendues peuvent également devenir, en l'absence de possibilités d'irrigation, un facteur crucial de réduction des productions végétales.

Néanmoins, les plantes ont adopté différentes stratégies pour survivre en situation de stress hydrique dont les principales consistent à :

- échapper au stress hydrique : la plante effectue son cycle de reproduction en dehors des périodes critiques,
- éviter le stress hydrique : la plante active des mécanismes qui permettent de maintenir un potentiel hydrique élevé, ceci en augmentant les capacités d'absorption de l'eau et/ou en réduisant les pertes. Ainsi pour mieux exploiter les réserves hydriques du sol, la plante va augmenter la profondeur de son système racinaire, sa densité et son degré de ramification. De plus, la fermeture des stomates, la diminution des surfaces évaporantes par enroulement foliaire, la sénescence et l'abscission précoces des feuilles sont autant de moyens pour limiter les pertes en eau.
- tolérer le stress hydrique : la plante fait appel à un processus de maintien osmotique : le maintien d'une turgescence positive est rendue possible par l'accumulation de solutés particuliers (proline, glycine, bétaïne, sucres).

Certaines protéines à propriétés hydrophiles marquées sont induites par le déficit hydrique et par l'acide abscissique. Appelées protéines RAB (Responsive to ABscissic acid) ou dehydrins, elles sont également synthétisées en grande quantité dans les embryons en cours de dessiccation : elles font partie des protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant proteins).

D'autres protéines induites par le déficit hydrique participent au phénomène d'ajustement osmotique ou de régulation des flux d'eau. Le déficit en eau peut également induire l'expression de protéines qui ne sont pas liées au stress, mais plutôt exprimées en réponse à des dommages causés à la cellule. Ainsi, différentes classes de gènes codant pour des protéines de choc thermique (heat shock protein), de protéases, d'inhibiteurs de protéases peuvent être induites dans cette situation.

D'autres études ont également montré que plusieurs gènes codant pour des protéines dont les fonctions ne sont pas directement liées au stress sont exprimés à des niveaux plus élevés

en condition de stress hydrique ou salin : par exemple des peroxydases, des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la glycolyse ou dans la synthèse de la méthionine.

Le déficit hydrique provoque donc chez les plantes des réponses diverses, tant au niveau morphologique qu'au niveau cellulaire. La fermeture des stomates, l'ajustement osmotique et l'inhibition de la croissance font partie des réponses les plus rapides.

Ces réponses sont au moins en partie contrôlées par l'acide abscissique (ABA), phytohormone dont la concentration augmente dans les plantes soumises à un stress hydrique.

Chez le maïs, l'approvisionnement en eau est un facteur essentiel du rendement. Ces besoins sont surtout importants 15 jours avant et 15 jours après la floraison de la plante (juillet - août). Pendant cette période, la plante absorberait 45% du total de ses besoins et elle atteint son niveau de sensibilité maximale à la sécheresse.

Ce besoin en eau, nécessaire au maintien de bons niveaux de rendements, est parfois difficile à satisfaire en période estivale. Quelques progrès ont été réalisés, en sélection variétale, pour obtenir des variétés plus productives en conditions hydriques défavorables, cependant des améliorations supplémentaires peuvent provenir de l'exploitation de la variabilité génétique qu'offre le maïs en matière de tolérance à la sécheresse.

L'identification de nombreux gènes permettent aujourd'hui l'étude plus précise des mécanismes de la réponse cellulaire à la contrainte hydrique. Certains gènes sont simplement affectés suite à des bouleversements du métabolisme cellulaire par le stress hydrique, d'autres ont un rôle actif dans la perception de la contrainte ou la réponse adaptative de la plante à la sécheresse.

Par ailleurs, la réponse du végétal dépend, entre autres, de paramètres environnementaux (type de contrainte, intensité, durée) et génétiques (espèce et génotype). L'analyse conjointe des variabilités induites par le génome et l'environnement peut aider à apprécier l'implication des gènes dans la réponse de la plante face à un déficit hydrique. Une approche générale envisageable consiste à étudier l'effet du stress sur l'expression globale du génome dans différents fonds génétiques selon deux niveaux : après transcription ("transcriptome") ou après traduction ("protéome").

Notre démarche s'inscrit dans la validation d'un gène quant à son rôle possible dans la réponse de la plante à un stress hydrique.

Nous avons utilisé pour la transformation des plantes de maïs, un ADNc d'une protéine mise en évidence lors de l'application d'une contrainte hydrique progressive sur des plantes de maïs.

Cette protéine présente un fort taux d'homologie avec la protéine ASR1 de la tomate (ASR pour ABA Stress Ripening induced Protein) qui est connue pour être induite par l'acide abscissique et pour être impliquée dans les mécanismes de maturité et de tolérance au stress.

Le choix de l'utilisation de l'ADNc de ce gène s'est fait sur la base de plusieurs critères:
- le taux d'ARN messager et de la protéine correspondante varie en fonction du stress hydrique,

- l'étude d'une population de lignées recombinantes a montré que lorsque les plantes sont cultivées en conditions de sécheresse, des QTL de sénescence foliaire et de protandrie ainsi qu'un QTL de la quantité de la protéine ASR1 sont regroupés dans la même région chromosomique que le gène codant pour cette protéine,
- l'analyse de 39 lignées non apparentées a permis de montrer que, pour un même génotype, plus la sénescence foliaire induite par le stress hydrique est importante plus la protéine est synthétisée (corrélation environnementale positive), et qu'il existe une corrélation génétique de signe opposé. Ceci suggère que la variation génétique de l'expression de la protéine joue un rôle dans le processus de sénescence.

Cet ensemble de données nous a conduit à rechercher si une surexpression ou une inhibition de ce gène pouvait affecter les capacités de tolérance à la sécheresse. Dans un premier temps, nous avons placé utilisé l'ADNc du gène *asr1* de maïs, en orientation sens ou antisens, sous le contrôle de régions régulatrices du promoteur du gène de l'actine 1 de riz. Dans le cadre de l'autorisation B/FR/01.03.04, nous avons conduit des essais en condition de fort stress hydrique et montré un effet positif direct de l'expression de la protéine ASR1 sur la tolérance à la sécheresse.

Cette tolérance a été évaluée à l'aide de plusieurs critères physiologiques, biologiques et *in fine* sur le rendement de plantes de maïs cultivées sous forme de lignées et d'hybrides (forme seule cultivée par les agriculteurs pour la production grainière ou l'ensilage).

Il a été montré récemment qu'un homologue du gène *asr1*, gène de fonction inconnue chez le maïs, code chez la vigne pour un facteur de transcription régulant le transport de sucres. Comme de nombreux travaux scientifiques montrent que l'effet d'un facteur de transcription, réintroduit par transgénèse, est fortement dépendant de son niveau et de son lieu d'expression, nous avons produit de nouveaux événements de transformation chez lesquels l'ADNc correspondant à *asr1* est placé, en orientation sens, sous le contrôle d'un promoteur fort - le promoteur du transcrite du Cassava Vein Mosaic Virus. Ce promoteur dirige un niveau d'expression plus élevé que celui de l'actine de riz, utilisé précédemment (événements de l'autorisation B/FR/01.03.04), et présente une activité tissulaire différente.

Afin d'étudier l'effet d'une expression forte de *asr1* sur la tolérance au stress hydrique, nous proposons de réaliser une expérimentation en champ avec des plantes de maïs transgéniques obtenues avec une nouvelle construction génétique.

Ce dossier a pour objet de rassembler les informations nécessaires à la mise au champ de l'ensemble des événements de transformation que nous souhaitons évaluer en conditions agronomiques normales et en conditions de stress hydrique piloté.

A. INFORMATIONS D'ORDRE GENERAL

A.1.a. Nom et adresse du notifiant

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

A.2. Nom, qualification et expérience des scientifiques responsables

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

A.3. Titre du projet

<p>Essai au champ de maïs destinés à valider la fonction d'un gène de tolérance au stress hydrique.</p>
--

Cette expérimentation s'inscrit dans la continuation d'un projet de recherche et de développement visant à valider le rôle potentiel du gène *asr1* de maïs dans le mécanisme de réponse cellulaire de la plante à un déficit hydrique. Nous souhaitons observer au champ, en condition agronomique de disponibilité en eau normale et réduite, le comportement d'événements de transformation exprimant le gène *asr1* en orientation sens sous le contrôle d'un promoteur fort.

B. INFORMATIONS CONCERNANT LES PLANTES RECEPTRICES

B.1. Nom complet

Nom de famille : Graminae
Genre : Zea
Espèce : mays
Sous-espèce : mays
Nom usuel : maïs

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

B.2. Informations concernant la reproduction

B.2.a. Mode de reproduction du maïs

i. Mode de reproduction

Le maïs est une plante monoïque à fleurs mâles et femelles portées sur la même plante mais séparées. Les fleurs mâles, regroupées au sommet de la tige en une inflorescence terminale appelée panicule, ne portent que des étamines entourées de glumelles. Elles apparaissent les premières (phénomène de protandrie). Les fleurs femelles, groupées en un ou plusieurs épis à l'aisselle des feuilles, n'apparaissent que par leurs longs styles appelés "soies" sortant des bractées ou spathes entourant chaque épi. Chaque fleur contient un ovaire unique, chaque épi comprend de 300 à 500 fleurs environ.

ii. Facteurs spécifiques affectant la reproduction

La reproduction de cette plante est assurée par la libération du pollen contenu dans les étamines (organes de la panicule) par ouverture des sacs polliniques ou anthères.

Le mode de reproduction du maïs est dit allogame (pollinisation par une autre plante de maïs) anémophile (pollinisation par le vent). La pollinisation du maïs en conditions naturelles se réalise principalement par fécondation croisée (allofécondation supérieure à 95%). Un faible taux d'autofécondation est néanmoins possible (inférieur à 5%).

iii. Temps de génération

Le maïs est une plante à cycle biologique court : le temps de génération du semis à la récolte des grains est d'environ 7 à 8 mois. Le semis, en France, a lieu à partir du mois d'avril et la récolte en octobre-novembre.

B.2.b. Compatibilités sexuelles avec d'autres espèces sauvages ou cultivées

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

B.3. Capacité de survie

B.3.a. Capacité à former des structures de survie ou de dormance

Le maïs est une plante annuelle qui se reproduit par graine et ne présente pas de moyens de reproduction végétative en conditions naturelles. Les semences sont nombreuses, mais leur viabilité est fortement limitée. Les semences sont en effet très sensibles aux maladies et au froid. Il n'y a en général pas de repousses à la suite d'une culture de maïs, seuls les épis non battus peuvent permettre au grain de conserver éventuellement une capacité de germination l'année suivante.

B.3.b. Facteurs spécifiques affectant la capacité de survie

Les graines ne présentent pas de dormance. Les conditions climatiques hivernales de manière générale ne permettent pas la repousse de cette plante. Les pratiques agricoles courantes conduisent également à la destruction des graines.

B.4. Dissémination

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

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

B.4.b. Facteurs spécifiques affectant la dissémination

La dissémination du maïs peut s'effectuer par l'intermédiaire du pollen et des graines :

- le pollen provenant de l'inflorescence mâle est dispersé par gravité et par le vent. Le début de la libération du pollen a lieu généralement deux ou trois jours avant l'apparition des soies des épis femelles. La durée de floraison des fleurs mâles est de 6 à 10 jours.
- la viabilité des semences est fortement limitée car elles sont sensibles aux maladies et surtout au froid hivernal. C'est pourquoi il n'y a en général pas de repousse de maïs.

B.5. Distribution géographique de la plante

Le maïs est dépendant de l'homme pour sa dispersion géographique. Le maïs est utilisé, soit comme ensilage, soit pour sa production de grains. Il s'agit de la première culture céréalière du monde en termes d'importance.

B.6. Description de l'habitat naturel de la plante (espèces ne poussant pas habituellement en UE)

Le maïs, originaire d'Amérique centrale, n'a pas d'habitat naturel en Europe. Il ne se développe pas en dessous de 9-10°C et a une température optimale de croissance de 30 à 33°C. En climat continental (Canada, URSS), le maïs est cultivé jusqu'au 60^{ème} parallèle.

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

B.7. Autres interactions potentielles avec des organismes dans l'écosystème habituel

Durant sa culture, le maïs peut être en interaction avec des ravageurs, présents dans le sol (taupins, vers gris), dans ses propres tissus (pyrales, sésamies) ou à sa surface (pucerons). Il est également en interaction avec des organismes pathogènes, essentiellement des champignons (*Fusarium*, *Helminthosporium*, *Ustilago*, etc).

C. INFORMATION CONCERNANT LA MODIFICATION GENETIQUE

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

Les maïs faisant l'objet de ce dossier ont été modifiés génétiquement par transfert d'un fragment d'ADN grâce à la technique de transformation par *Agrobacterium tumefaciens*.

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

C.2. Nature et source du vecteur utilisé

Le vecteur utilisé pour la transformation du maïs par *Agrobacterium tumefaciens* est un plasmide appelé vecteur binaire.

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

Une seule construction génétique est portée par le vecteur utilisé pour le transfert de gènes ; elle est constituée par un gène marqueur transférant la résistance à un herbicide -le glufosinate- et d'une séquence du gène *asr1* de maïs mis sous le contrôle d'un promoteur fort -le promoteur du transcrit du virus de la mosaïque du manioc.

La présence de ces séquences conduit à l'expression du gène *asr1*, conférant une tolérance au stress hydrique ainsi qu'une résistance à l'herbicide glufosinate.

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

D. INFORMATION CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE

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

Les plantes de maïs faisant l'objet de cette demande d'essai en champ ont été modifiées pour valider le rôle possible du gène *asr1*, sous contrôle d'un promoteur fort, dans le processus de meilleure tolérance de la plante de maïs à un déficit hydrique. Les plantes expriment le gène *asr1* et sont également tolérantes à la phosphinothricine (ou glufosinate).

D.2. Informations sur les séquences réellement insérées ou délétées

Les séquences réellement transférées ont été recherchées par analyse Southern sur des plantes de première génération. La caractérisation moléculaire a été effectuée en utilisant différentes sondes moléculaires permettant de démontrer l'insertion dans le génome de la plante des deux gènes, gène d'intérêt (*asr1*) et de sélection (résistance au glufosinate). Cette caractérisation a permis de montrer que les gènes ont été intégrés d'une façon stable.

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

D.3. Information concernant l'expression de l'insert

L'expression de l'insert est mise en évidence par analyse moléculaire ou biochimique (détection de la protéine ASR1 sur gel d'électrophorèse bidimensionnelle) ainsi que par l'observation du phénotype de résistance des plantes au glufosinate.

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

D.4.a. Mode / vitesse de reproduction

A priori, aucun changement majeur dans le mode et la vitesse de reproduction de la plante transgénique n'est attendu suite à l'expression d'un gène potentiellement impliqué dans les mécanismes de tolérance à un stress hydrique. Les plantes transgéniques cultivées en serre ainsi que les lignées cultivées au champ exprimant le même gène sous le contrôle d'un promoteur différent (dossier B/FR/01.03.04) présentaient, sur plusieurs générations, une fertilité et un aspect général semblables aux plantes de maïs non transgéniques.

D.4.b. Dissémination

Les capacités de dissémination des plantes restent, *a priori*, inchangées par rapport aux plantes de maïs non transgéniques. Aucune différence de comportement par rapport à la lignée d'origine qui pourrait avoir un éventuel effet sur les performances de dissémination n'a été mise en évidence pour les différentes générations cultivées en serre (production de pollen, précocité de floraison, morphologie de l'épi, ...).

D.4.c. Capacité de survie

Cette capacité ne semble pas devoir être affectée : la résistance à la phosphinothricine (ou glufosinate), conférée aux plantes génétiquement modifiées, ne présente pas d'avantage sélectif en dehors des pressions de sélection induites par l'application de l'herbicide. Or cet herbicide n'est pas utilisé sur les cultures de maïs, et les plantes faisant l'objet de ce dossier ne présenteront donc pas d'avantage par rapport aux variétés conventionnelles. La sur-expression de la protéine ASR1 ne semble pas devoir modifier cette capacité de survie.

D.5. Stabilité génétique de l'insert et stabilité phénotypique de la plante modifiée

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

D.6. Modification de la capacité de la plante modifiée à transférer du matériel génétique dans d'autres organismes

Les études menées jusqu'à présent n'ont pas permis de mettre en évidence un transfert de gène dans la nature entre bactéries et eucaryotes. En ce qui concerne le transfert horizontal, aucune donnée ne laisse supposer que les transgènes puissent avoir un comportement différent de celui de tout autre gène végétal. Des informations supplémentaires sont disponibles, en anglais, sur le site <http://europa.eu.int/comm/research/quality-of-life/gmo/index.html>.

Les transferts interspécifiques et intergénériques ne sont pas possibles dans le cas du maïs cultivé en France car aucun genre et aucune espèce ne peuvent être fécondés par le pollen de maïs.

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

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

La modification génétique confère aux plantes transgéniques la résistance au glufosinate (herbicides Basta[®] et Liberty Link[®]) et, en raison de la sur-expression du gène *asr1*, une meilleure résistance de la plante au stress hydrique. Les deux gènes introduits responsables de ces caractères ne présentent pas de risque de toxicité particulier.

Une étude a montré que la phosphinotricine acétyltransférase codée par le gène de résistance au glufosinate, enzyme qui détoxifie la phosphinotricine (principe actif de l'herbicide Basta[®]) est dégradée en quelques secondes par les sucs gastriques humains. Cette protéine, exprimée de façon constitutive dans les plantes, ne semble donc pas pouvoir entraîner de réponse allergique après ingestion.

Le gène *asr1* est un gène endogène du maïs, plante qui ne présente pas de toxicité connue. Le produit de ce gène n'a donc à priori pas de caractère de toxicité.

A ce jour nous ne disposons d'aucun élément conduisant à supposer que les séquences introduites puissent présenter une toxicité.

D. 8 Information concernant la sécurité de la plante modifiée pour la santé des animaux, lorsque la plante est destinée à être utilisée dans l'alimentation animale

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

L'effet de l'ingestion de parties végétatives de la plante ou de graines par des animaux éventuellement présents sur les sites d'essai peut être considéré sans conséquence vis à vis de ces organismes non cibles.

D.9 Mécanisme d'interaction entre la plante modifiée et les organismes cibles

Cette modification génétique ne vise aucun organisme-cible.

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

Aucune interaction particulière n'est attendue avec des organismes non cibles. La protéine phosphinotricine acétyltransférase (produit du gène de résistance au glufosinate) n'est pas connue pour présenter de toxicité.

Aucune information ne laisse supposer que l'expression de la protéine ASR1 de maïs puisse être associée à une quelconque toxicité.

D. 11 Interactions potentielles avec l'environnement abiotique

Aucune interaction potentielle de cet ordre n'est envisagée.

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

Les plantes transgéniques retenues pour cet essai sont identifiables par leur phénotype de tolérance à la phosphinotricine ou glufosinate (tolérance aux herbicides Basta[®] ou Liberty[®]).

Des techniques moléculaires peuvent également être utilisées telles que les techniques de Southern, d'électrophorèse des protéines ou d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) sur les séquences des gènes transférés. Ces techniques permettent alors une identification fiable des plantes transgéniques.

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

Il s'agit de la première demande d'expérimentation au champ pour les événements de transformation qui font l'objet de cette demande d'expérimentation au champ. Cependant des plantes transgéniques exprimant l'ADNc de *asr1* sous le contrôle d'un autre promoteur ont été cultivées au champ en 2001, 2002 et 2003.

E. INFORMATION CONCERNANT LE SITE DE DISSEMINATION

E.1. Localisation et étendue des sites de dissémination

La localisation précise des sites d'essais n'étant pas connue au moment de la rédaction du dossier. Le nom des communes où auront lieu ces essais seront fournis dans les Fiches d'Information du Public.

Les sites de dissémination pour l'année 2005 se situeront dans les départements de Charente-Maritime, Puy-de-Dôme et Haute-Garonne. Chaque essai devrait couvrir une surface totale de 7 000 m² dont 1 500 m² environ couverts par les plantes transgéniques.

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

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

- non nécessairement isolées dans le cas où les panicules de plantes transgéniques seraient castrées et /ou les panicules empochées,
- isolées de 200 mètres de toute culture commerciale de maïs si les plantes transgéniques ne seraient pas castrées ou si leur panicule ne serait pas empochée.

Les climats dans les trois régions de culture sont variables, avec un climat de type océanique plus ou moins prononcé qui se traduit par des hivers doux et des étés relativement frais, en Charente-Maritime et Haute-Garonne. Dans le Puy-de-Dôme, le climat est de type continental avec des hivers rudes et des étés chauds.

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

Aucune espèce sexuellement compatible avec le maïs n'est présente à proximité des différents sites de dissémination. Aucun risque de dissémination de la modification génétique n'est donc attendu par hybridation interspécifique.

Des champs de maïs peuvent être présents à proximité des sites d'expérimentation. Cependant, les précautions sont prises (respect d'une distance d'isolement ou castration/mise sous poche d'autofécondation) pour éviter toute dissémination de gène *via* le pollen à partir des plantes transgéniques en culture.

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

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

F. INFORMATION CONCERNANT LA DISSEMINATION

F.1. Objectif de la dissémination

L'objectif de la dissémination est de compléter l'évaluation du rôle potentiel du gène *asr1* de maïs dans le processus de défense de la plante face à un stress hydrique. Pour évaluer le rôle de ce gène dans la tolérance des plantes à la sécheresse, les plantes transformées sur-exprimant le gène seront cultivées en conditions normales (culture conventionnelle avec irrigation) et en conditions de stress hydrique piloté à l'aide de sondes tensiométriques.

De nombreuses mesures et observations seront réalisées au cours de la culture et à la récolte des plantes (protandrie, surface et index foliaires, composantes du rendement et rendement en biomasse et en grain, pourcentage de fécondation, ...).

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

F.2. Date et durée prévues de l'opération

L'essai est prévu d'avril à novembre pour la campagne 2005. Les autres campagnes se dérouleront d'avril à novembre 2006, 2007 et 2008.

Les semis seront effectués en avril-mai, les récoltes de fin septembre à mi-novembre environ. Ces dates sont indicatives et modifiables en fonction des conditions climatiques.

F.3. Méthode de dissémination envisagée

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

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

La préparation du sol sera effectuée selon les pratiques agricoles courantes. Après un labour et une préparation du lit de semis, les traitements du sol seront réduits aux traitements herbicides (par un herbicide homologué sur cette culture), insecticides ou anti-limaces sur les sites d'expérimentation.

Les traitements en cours de culture seront adaptés au type d'expérimentation.

La récolte des épis sera soit manuelle soit mécanique. Ces épis seront rapatriés au laboratoire où les graines seront conservées jusqu'à leur semis ou analyse.

Les résidus végétaux (épis non récoltés, tiges et feuilles) seront broyés sur place mécaniquement. Les résidus broyés seront ensuite enfouis par un travail superficiel du sol. Un labour d'hiver sera ensuite effectué. Aucune culture commerciale de maïs ne sera implantée sur les parcelles d'essai l'année suivante ; les éventuelles repousses de maïs seront détruites avant floraison.

F. 5. Nombre approximatif de plantes

Le nombre total de plantes transgéniques cultivées sera de 18 000 environ.

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

G. 1. Précautions prises

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

Les plantes transgéniques faisant l'objet de cette demande d'essai en champ seront, selon le cas, castrées ou ensachées. Leur pollinisation sera assurée par des lignées de maïs non-transgénique ou par leur propre pollen. Cependant, si les plantes étaient laissées en pollinisation libre pour les besoins de l'expérimentation, une distance d'isolement de 200 m sera respectée par rapport aux cultures commerciales de maïs.

En Europe, il n'existe pas d'autre espèce végétale sexuellement compatible avec le maïs.

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

Les risques de dissémination de pollen transgénique sont très réduits puisque les plantes de la parcelle d'expérimentation ne produiront pas de pollen (castration ou mise sous poche) ou seront isolées de toute autre culture commerciale de maïs. En fin d'essai, ces plantes seront broyées et les résidus enfouis sur place.

Après semis, le surplus éventuel de graines est récupéré et rapatrié au laboratoire pour destruction. Ces précautions réduisent les risques de dissémination des graines en dehors de la parcelle d'expérimentation.

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

Après la récolte, les résidus de plantes (tiges, feuilles et racines) seront détruits par broyage et les restes seront enfouis sur la parcelle.

Les parcelles feront l'objet d'une surveillance régulière l'année suivant l'essai afin d'éliminer toute éventuelle repousse de maïs avant la floraison.

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

Le produit des récoltes sera transféré dans un laboratoire. Les épis et semences des hybrides expérimentaux produits seront stockés puis utilisés pour des semis ultérieurs en serre ou en champ (campagne 2006, 2007 et 2008). Les surplus de matériel végétal seront détruits par broyage et enfouissement sur la parcelle.

G. 4. Description des plans et techniques de surveillance

Pendant la culture, l'essai sera suivi très régulièrement par le personnel responsable de la dissémination. La conformité de l'expérimentation aux conditions décrites dans ce dossier et dans l'autorisation du Ministère de l'Agriculture sera contrôlée par des agents assermentés des services de la Protection des Végétaux.

Après la fin de l'essai, plusieurs visites des parcelles seront effectuées et plus particulièrement au printemps pendant la période de germination des graines. Les éventuelles repousses de maïs seront éliminées avant floraison.

G. 5. Description des plans d'urgence

Ces essais pourront être arrêtés en cas d'urgence (accident climatique majeur, ...). Les méthodes de destruction volontaire seront adaptées au stade de développement des plantes (traitement herbicide, broyage éventuellement après récolte des débris dispersés...). Elles seront appliquées dès que possible après la fin des constatations d'usage en pareil cas.

G. 6. Méthodes et procédures de protection du site

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

Annexe II D.2 Conclusions concernant les incidences potentielles sur l'environnement de la dissémination

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

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

Le produit utilisé pour la sélection des plantes transformées en serre ou en champ – phosphinothricine, herbicide total– n'est pas homologué en Europe pour des applications sur les cultures commerciales de céréales. Ils ne seront appliqués éventuellement lors des essais que par "mouillage de la feuille", sur quelques cm² de chaque plante, dans le but de repérer les plantes porteuses de la modification génétique. En l'absence d'utilisation de ce produit et donc en l'absence de pression de sélection, il est hautement improbable que les maïs faisant l'objet de cet essai deviennent plus persistants dans les habitats agricoles ou naturels.

2. Avantages ou inconvénients sélectifs conférés aux plantes modifiées

Deux caractères sont présents dans les maïs qui font l'objet de cette expérimentation :

- une tolérance à l'herbicide phosphinothricine, portée par le gène de sélection qui a servi à sélectionner les plantes transgéniques en cours de régénération,
- une tolérance au stress hydrique par la sur-expression de la protéine ASR1 de maïs.

Aucun avantage ou inconvénient sélectif ne semble devoir être conféré à ces plantes, dans les conditions de l'essai, car aucune pression de sélection ne sera appliquée puisqu'il n'y aura pas de traitement par l'herbicide phosphinothricine, si ce n'est par mouillage de la feuille afin de repérer les plantes transformées. Dans ces conditions de traitement, aucune plante, qu'elle soit sensible ou résistante, n'est détruite et la pression de sélection est quasi-nulle.

Aucune pression de sélection ne découlera de la sur-expression de la protéine ASR1 de maïs.

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

La seule espèce sexuellement compatible en Europe est le maïs. Le transfert de matériel génétique *via* le pollen vers d'autres cultures de la même espèce sera peu probable étant donné les précautions prises (castration, mise sous poche ou établissement d'une distance d'isolement). La culture du maïs dans les agrosystèmes à partir de semences hybrides produites selon un cahier de charges rigoureux, la non-utilisation de "semences de ferme" rendent les possibilités d'obtenir des plantes descendantes d'inter-croisement suite à un flux pollinique très improbables. Combiné à l'absence d'avantage sélectif dans les conditions de culture du maïs, ce transfert peut être considéré comme un risque très minime.

Il n'existe pas en Europe d'espèces apparentées au maïs qui pourraient être réceptrices pour ce pollen et aucun avantage ou inconvénient ne peut être conféré.

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

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

Aucune interaction n'est attendue entre le produit du gène de résistance au glufosinate (protéine phosphinotricine acétyltransférase) et des organismes cibles. En l'absence d'application de l'herbicide sur la parcelle d'essai (hors mouillage localisé de la feuille afin de repérer les plantes transgéniques), aucun effet éventuel n'est attendu.

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

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

Aucune interaction n'est attendue entre le produit produit du gène de résistance au glufosinate et des organismes non-cibles. En l'absence d'application de phosphinotricine sur la parcelle d'essai (hors mouillage de la feuille afin de repérer les plantes transgéniques), aucun effet éventuel n'est attendu.

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

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

La protéine ASR1 sur-exprimée dans ces événements de transformation est une protéine endogène du maïs. Nous n'avons pas connaissance, à ce jour, d'un effet toxique éventuellement lié à cette protéine. Les personnes ayant été en contact avec les plantes transgéniques exprimant cette protéine n'ont présenté aucun symptôme ou aucune pathologie qui seraient éventuellement liés à ce contact.

Une étude a montré que la phosphinotricine acétyltransférase codée par le gène de résistance au glufosinate, enzyme qui détoxifie la phosphinotricine, est dégradée en quelques secondes par les sucs gastriques humains. Cette protéine, exprimée de façon constitutive dans les plantes, ne semble pas pouvoir entraîner de réponse allergique après ingestion. Aucune allergie de contact n'a été développée par les personnels de laboratoire qui manipulent depuis de nombreuses années des plantes transgéniques exprimant ce gène de sélection.

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

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

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

Aucune consommation des plantes génétiquement modifiées n'est prévue, les produits végétaux de cet essai ne seront pas consommés ; ils seront soit détruits, soit ramenés au laboratoire à des fins d'analyse. On ne peut exclure que de petits animaux puissent être présents sur l'essai et consommer de faibles quantités de feuilles. Cependant aucun effet n'est à priori attendu (voir ci-dessus les paragraphes 5 et 6).

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

Les interactions directes et indirectes, générées par la modification génétique des plantes de maïs qui font l'objet de ce dossier et les organismes cibles et non-cibles sont d'effets éventuels très limités (voir les paragraphes 4, 5 et 6). Les niveaux d'expression géniques des gènes de résistance au glufosinate et *asr1*, le traitement des produits végétaux après la récolte, et le respect des conditions classiques de culture du maïs (façon culturale, fertilisation, irrigation, traitements herbicides, insecticides et fongicides) ne sont pas de nature, à priori, à modifier les incidences sur les processus biogéochimiques par rapport aux incidences de la culture de maïs conventionnel.

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

Dans le cadre de cette expérimentation, aucune incidence n'est attendue. Cependant, si le développement de plantes de maïs sur-exprimant la protéine ASR1 devait se produire, il aurait pour effet, une amélioration de la tolérance des plantes de maïs au stress hydrique et un meilleur rendement en biomasse de ces plantes, en condition de sécheresse. Un tel développement aurait pour conséquence une meilleure gestion des irrigations accompagnée d'une réduction des coûts de production agricoles et des puisages dans les eaux de surface et souterraines. Il s'accompagnerait également d'une réduction de l'utilisation des ressources énergétiques.

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