

**SOCIETE BIOGEMMA**



Demande d'autorisation auprès du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche

**Essais au champ de maïs génétiquement modifiés pour  
l'amélioration des performances photosynthétiques de la plante  
en conditions de stress hydrique**  
(demande pluriannuelle)

**Dossier B/FR/06.01.13**

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



## SOMMAIRE

<b>Introduction</b>	<b>9</b>
<b>A. Informations d'ordre général</b>	<b>13</b>
A.1 Nom et adresse du notifiant	13
A.2 Nom, qualification et expérience des scientifiques responsables	13
A.3. Titre du projet	13
A.4. Développements ultérieurs envisagés	14
<b>B. Informations concernant les plantes réceptrices</b>	<b>14</b>
B.1 Nom complet	14
B.2.a Informations concernant la reproduction	14
B.2.b Compatibilité sexuelle avec d'autres espèces sauvages ou cultivées	14
B.3 Capacité de survie	15
B.4 Dissémination	15
B.5 Distribution géographique de la plante	15
B.6 Description de l'habitat naturel de la plante (espèces ne poussant pas habituellement en UE)	15
B.7 Autres interactions potentielles avec des organismes dans l'écosystème habituel	16
<b>C. Informations concernant la modification génétique</b>	<b>17</b>
C.1 Description des méthodes utilisées pour la modification génétique	17
C.2 Nature et source du vecteur utilisé	17
C.3 Taille, origine des organismes donneurs et fonction recherchée de chaque fragment constitutif de la région envisagée pour l'insertion	17
<b>D. Informations concernant la plante supérieure génétiquement modifiée</b>	<b>19</b>
D.1 Description du ou des caractères ou des caractéristiques qui ont été introduits ou modifiés	19
D.2 Informations sur les séquences réellement insérées ou délétées	19
D.3 Informations concernant l'expression de l'insert	19
D.4 Description des différences entre la plante génétiquement modifiée et la plante réceptrice	20
D.5 Stabilité génétique de l'insert et stabilité phénotypique de la plante modifiée	20
D.6 Modifications de la capacité de la plante modifiée à transférer du matériel génétique dans d'autres organismes	20
D.7 Informations concernant les effets toxiques, allergisants ou autres effets nocifs résultants de la modification génétique sur la santé humaine	21
D.8 Informations concernant la sécurité de la plante modifiée pour la santé des animaux, lorsque la plante est destinée à être utilisée dans l'alimentation animale	22
D.9 Mécanisme d'interaction entre la plante modifiée et les organismes cibles	22
D.10 Modifications potentielles des interactions de la plante modifiée avec les organismes non-cibles résultant de la modification génétique	22
D.11 Interactions potentielles avec l'environnement abiotique	22
D.12 Description des méthodes de détection et d'identification de la plante	22

supérieure génétiquement modifiée	23
D.13 Informations, le cas échéant, sur les précédentes disséminations de la plante génétiquement modifiée	23
<b>E. Informations concernant le site de dissémination</b>	<b>24</b>
E.1 Localisation et étendue des sites de dissémination	24
E.2 Description de l'écosystème des sites de dissémination	24
E.3 Présence d'espèces apparentées sauvages sexuellement compatibles ou d'espèces végétales cultivées sexuellement compatibles	25
E.4 Proximité des sites de biotopes officiellement reconnus ou de zones protégées susceptibles d'être affectées	25
<b>F. Information concernant la dissémination</b>	<b>26</b>
F.1 Objectif de la dissémination	26
F.2 Date et durée prévues de l'opération	27
F.3 Méthode de dissémination envisagée	27
F.4 Méthode de préparation et gestion du site avant, pendant et après la dissémination, y compris les pratiques culturales et méthodes de récolte	27
F.5 Nombre approximatif de plantes	27
<b>G. Information sur les plans de surveillance, de contrôle et de traitement du site et des déchets après dissémination</b>	<b>28</b>
G.1 Précautions prises	28
G.2 Description des méthodes de traitement du site après dissémination	28
G.3 Description des méthodes de traitement après dissémination pour le matériel issu de plantes génétiquement modifiées, y compris les déchets	29
G.4 Description des plans et techniques de surveillance	29
G.5 Description des plans d'urgence	29
G.6 Méthodes et procédures de protection du site	29
<b>H. Conclusions concernant les incidences potentielles sur l'environnement de la dissémination</b>	<b>30</b>
H.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	30
H.2. Avantages ou inconvénients sélectifs conférés aux plante modifiées	30
H.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	31
H.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	31
H.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	31
H.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	32
H.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	32
H.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	32
H.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	33
<b>I. Références bibliographiques</b>	<b>34</b>



## **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 essai en champ qui fait suite à différentes expérimentations qui ont été menées en serre et au champ, dans ce dernier cas sous le couvert d'autorisations délivrées en 2003 et 2005.

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.



## INTRODUCTION

Chez les plantes supérieures, 98% en moyenne de l'eau absorbée par les racines ne fait que transiter au travers du végétal, les 2% restants participent à la croissance des tissus et uniquement 0,02% entrent dans le métabolisme (Robelin, 1984). Cet état est dû au fait que l'absorption du CO<sub>2</sub> et la transpiration de la plante sont tous deux sous la dépendance d'un même phénomène : l'ouverture des stomates. Les plantes se sont adaptées pour une optimisation de la croissance (le degré d'ouverture stomatique doit être suffisant pour l'assimilation de CO<sub>2</sub> sans pertes d'eau excessives) associée à des stratégies qui permettent de minimiser les effets d'un déficit hydrique.

On distingue classiquement trois types d'adaptation :

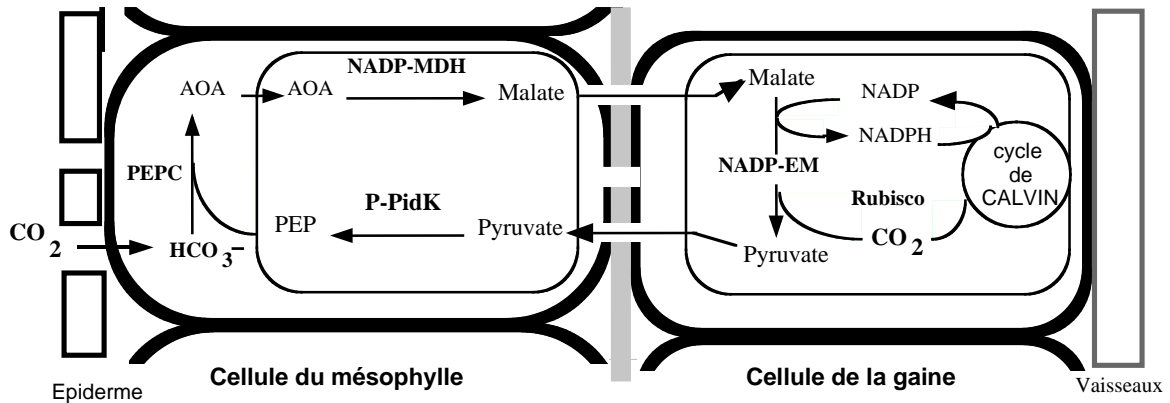
- l'échappement : décalage entre le cycle de développement et de reproduction et la phase climatique de limitation. Cependant l'augmentation de la précocité permettant de réduire la durée du cycle de culture a souvent une corrélation négative avec le potentiel de rendement.

- l'évitement : maintien du potentiel hydrique par optimisation de l'absorption racinaire de l'eau et / ou la réduction de la transpiration.

- la tolérance : capacité à maintenir une activité cellulaire optimale malgré un potentiel hydrique très négatif. L'homéostasie de la turgescence se fait par accumulation de solutés comme les ions potassium, des sucres solubles, des acides aminés et plus particulièrement la proline et enfin des acides organiques notamment l'acide malique.

En raison de son importance économique, l'impact négatif du déficit hydrique sur la productivité des végétaux a suscité de nombreux travaux. Face au déficit hydrique, la plante met en œuvre différentes réponses morphologiques et cellulaires. Ainsi, dans de nombreux cas expérimentaux, au fur et à mesure de l'application de la sécheresse, on observe dans un premier temps une diminution de la vitesse de croissance des organes assimilateurs, puis plus tard, une inhibition de l'assimilation photosynthétique du CO<sub>2</sub> (Boyer, 1970 ; Ephrath et Kesketh, 1991). Différentes hypothèses sont émises pour rendre compte de l'effet de cette contrainte sur la photosynthèse. Récemment, Tezara *et al.* (1999) ont suggéré que le déficit hydrique inhibe la photosynthèse en réduisant l'efficacité du facteur de couplage et la production d'ATP. Cependant une autre hypothèse propose que la fermeture stomatique seule peut rendre compte de l'inhibition observée (Cornic, 2000). Dans ce cas, la conductance stomatique est diminuée, ce qui a pour conséquence d'affaiblir la capacité d'assimilation du CO<sub>2</sub>.

Chez le maïs, plante de type C<sub>4</sub>, la photosynthèse implique deux cycles - cycle C<sub>4</sub> et cycle de Benson-Calvin - localisés dans les tissus du mésophylle et de la gaine périvasculaire : figure 1 ci-dessous.



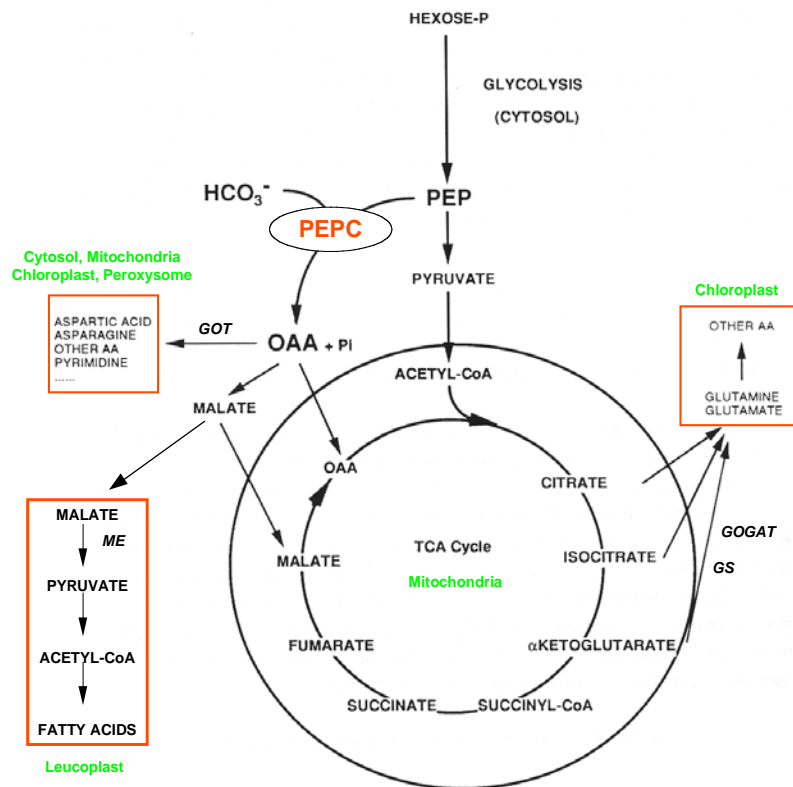
**Figure 1 : Représentation schématique des cycles de la photosynthèse C<sub>4</sub> chez le Maïs**

*PEPC* : phosphoénolpyruvate carboxylase, *AOA* : oxaloacétate, *NADP-MDH* : malate déshydrogénase à NADP, *NADP-EM* : enzyme malique à NADP, *Rubisco* : ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase, *P-PidK* : pyruvate-Pi dikinase, *PEP* : phosphoénolpyruvate, *HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>* : hydrogencarbonate

Dans ce système photosynthétique la PhosphoEnolPyruvateCarboxylase (désignée par l'abréviation PEPC dans la suite de ce document) dans les plantes C<sub>4</sub> catalyse la première étape de fixation du CO<sub>2</sub> dans le cytosol des cellules du mésophylle ; le malate formé dans le chloroplaste est le vecteur de pouvoir réducteur et de CO<sub>2</sub> aux chloroplastes de la gaine. Ce mécanisme d'adaptation est assimilable à une pompe qui concentre le CO<sub>2</sub> auprès de la RuBisCO qui intègre le CO<sub>2</sub> dans une molécule glucidique. Il rend également compte du fait que les plantes C<sub>4</sub> ont une photorespiration faible (rapport CO<sub>2</sub> / O<sub>2</sub> augmenté et point de compensation de l'ordre de quelques % en CO<sub>2</sub>) et une meilleure efficacité d'utilisation de l'eau en conditions d'environnement naturel (tropical, semi aride). Ainsi, pour produire la même quantité de biomasse, les plantes C<sub>4</sub> nécessitent environ deux fois moins d'eau (400-600 moles d'eau absorbées par mole de CO<sub>2</sub> fixé) que les plantes C<sub>3</sub> (700-1300 moles d'eau /mole de CO<sub>2</sub> fixé).

La PEPC C<sub>4</sub> est une enzyme homotétramérique, régulée aux niveaux transcriptionnel, post-transcriptionnel et métabolique. A l'Institut de Biotechnologie des Plantes d'Orsay il a été montré que l'expression du gène codant pour la PEPC C<sub>4</sub> dépend de la lumière tant en qualité qu'en quantité. Le phytochrome est le photorécepteur et le niveau d'expression de la PEPC dépend de l'intensité lumineuse. Il est par ailleurs connu que ce gène répond aux phytohormones, en particulier les cytokinines (Suzuki *et al.*, 1994). La PEPC C<sub>4</sub> est soumise à une phosphorylation diurne (sur un résidu sérine, Ser8, du domaine N-terminal de la sous-unité) qui dépend du fonctionnement photosynthétique. Cette modification post-traductionnelle interagit avec la régulation métabolique de l'enzyme, affaiblissant sa sensibilité au malate qui est un rétro-inhibiteur) et renforçant l'affinité d'effecteurs allostériques antagonistes comme le glucose-6-phosphate. L'activité de la PEPC kinase est contrôlée par une chaîne de transduction complexe et un événement de synthèse protéique. Au total, il apparaît que ce processus permet à la PEPC C<sub>4</sub> de fonctionner dans un environnement cellulaire riche en malate. En effet le blocage expérimental *in planta* de la phosphorylation de l'enzyme à la lumière a pour conséquence d'inhiber fortement l'assimilation du CO<sub>2</sub>.

La PEPC est généralement représentée par différentes isoformes (chez la plante C<sub>4</sub>, deux à trois formes de type C<sub>3</sub> accompagnent la forme photosynthétique) qui se distribuent dans les différents organes de la plante. Toutes les formes de l'enzyme sont susceptibles de contribuer à un autre rôle physiologique majeur : la fonction anapylrotique dont la figure 2 détaille les éléments métaboliques. Dans ce cas, l'enzyme est sollicitée quand la demande carbonée pour la synthèse des acides aminés et des acides gras augmente. Cette fonction est notamment mise à contribution lors de la floraison et du remplissage des grains, phases caractérisées par la remobilisation de l'azote et du carbone foliaires. C'est précisément la phase critique de l'établissement des composantes majeures du rendement chez le maïs pendant laquelle la demande en eau est forte.



**Figure 2 : Fonction anapylrotique de la PEPC**

*PEPC* : phosphoénolpyruvate carboxylase, *OAA* : oxaloacétate, *ME* : enzyme malique, *PEP* : phosphoénolpyruvate,  $HCO_3^-$  : hydrogénocarbonate, *Hexose-P* : hexose phosphate, *GS* : glutamine synthétase, *GOGAT* : glutamate synthase, *GOT* : glutamate oxaloacetate transaminase (ou aspartate aminotransferase.), *TCA cycle* : cycle des acides tricarboxyliques.

D'après Bailey *et al.* (2000), la PEPC C<sub>4</sub> exerce un contrôle significatif du flux photosynthétique (coefficient de contrôle de 0,35). Le coefficient de contrôle est augmenté lorsque la concentration en CO<sub>2</sub> intercellulaire (C<sub>i</sub>) diminue. Par ailleurs, il est suggéré que dans ce cas, la régulation post-traductionnelle de l'enzyme ne compense pas totalement la réduction d'activité due à la limitation en ce substrat. Dans la mesure où la C<sub>i</sub> diminue lorsque la plante est soumise à un stress hydrique, la PEPC catalyse une étape limitante de la voie

photosynthétique (Von Caemmerer *et al.*, 1998). Notre hypothèse de travail est qu'une plus forte capacité de l'enzyme foliaire est susceptible d'améliorer la fixation nette de CO<sub>2</sub> et, éventuellement de permettre une meilleure remobilisation de l'azote, lors de la floraison, la formation de l'épi et le remplissage des grains au cours de la contrainte hydrique.

Cet ensemble de données nous a conduit à étudier l'effet d'une sur-expression de l'enzyme PEPC C<sub>4</sub> de sorgho dans la feuille et dans les grains de maïs dans le but d'améliorer la tolérance au stress hydrique. Des plantes transgéniques sur-exprimant de façon significative l'enzyme (jusqu'à 220 % de l'activité de plantes non-transgéniques) ont été produites au laboratoire. Des analyses du comportement photosynthétique de ces plantes en situation de contrainte hydrique en serre ont permis de montrer que le coefficient d'utilisation en eau est significativement augmenté de + 25% (Jeanneau, 2001).

Dans le cadre d'un premier dossier (B/FR/03.03.04, autorisation 03/015 en date du 19 mai 2003), nous avons mené une expérimentation afin d'étudier la construction génétique : promoteur *pepc-pepc* associé au gène de sélection *bar* de résistance au glufosinate, (White *et al.*, 1990). Au cours des essais menés en 2003, 2004 et 2005, il a été possible de mettre en évidence un effet du transgène. Cet effet se traduit par un maintien partiel du rendement grainier et du rendement en biomasse de la plante, en condition de stress hydrique fort, comparativement aux rendements observés en conditions d'irrigation optimales.

En 2005, l'autorisation 05/008, en date du 27 avril 2005, accordée au dossier B/FR/05.02.03 a permis de confirmer les résultats ci-dessus sur quatre nouveaux événements de transformation, associant la même construction génétique (promoteur *pepc-pepc*) à un autre marqueur de sélection, le gène *nptII*.

Notre objectif est d'évaluer, en conditions agronomiques, sur une douzaine de lieux de caractéristiques pédo-climatiques différentes, le potentiel de rendement de trois événements de transformation parmi les vingt-quatre du dossier B/FR/03.03.04 et de trois événements de transformation parmi les quatre du dossier B/FR/05.02.03. Ces événements ont été choisis à la suite des essais au champ réalisés de 2003 à 2005 ; ils seront comparés entre eux dans les mêmes lieux et mêmes conditions de culture.

Le présent dossier a pour objet de demander une autorisation d'essais au champ pour un nombre de lieux et pour des surfaces permettant une évaluation agronomique multi-locale fiable du caractère quantitatif qui a été modifié.

## **A. INFORMATIONS D'ORDRE GENERAL**

### **A.1. Nom et adresse du notifiant**

Le notifiant est :

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

### **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, en France, en Espagne et aux Etats Unis. Ces essais, sur plusieurs espèces végétales, portaient aussi bien sur des caractères de types agronomiques que des caractères relatifs à la qualité des produits récoltés.

### **A.3. Titre du projet**

<p><b>Essais au champ de maïs génétiquement modifiés pour l'amélioration des performances photosynthétiques de la plante en conditions de stress hydrique.</b></p>
--

### **A.4. Développements ultérieurs envisagés**

Ces événements de transformation feront l'objet d'une évaluation de leur rendement en conditions de stress hydrique ; à ce stade, et dans l'attente de résultats d'évaluation plus complets, il n'est pas prévu de développement pour ces événements de transformation.

## **B. INFORMATIONS CONCERNANT LES PLANTES RECEPTRICES**

### **B.1. Nom complet**

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

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

### **B.2. 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 Europe 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 sous les climats tempérés. 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 de gènes du maïs peut s'effectuer par l'intermédiaire du pollen et des graines :

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

### **B.5. Distribution géographique de la plante**

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

### **B.6. Description de l'habitat naturel de la plante (espèce 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<sup>ème</sup> parallèle.

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

### **B.7. Autres interactions potentielles de la plante avec des organismes dans l'écosystème habituel**

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

## **C. INFORMATIONS CONCERNANT LA MODIFICATION GENETIQUE**

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

Les plantes de maïs faisant l'objet de ce dossier ont été obtenues grâce à la technique de transformation par *Agrobacterium tumefaciens*.

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.

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

Le vecteur utilisé pour la transformation du maïs par *Agrobacterium tumefaciens* se présente sous la forme d'un plasmide superbinaire d'environ 50 kb. Il comprend notamment :

- une origine de réplication plasmidique nécessaire au maintien et à la multiplication du plasmide dans *Escherichia coli*.
- une origine de réplication fonctionnelle dans *Agrobacterium tumefaciens* et dans *Escherichia coli*,
- les gènes *virB*, *virC* et *virG* d'*Agrobacterium tumefaciens* dont les produits augmentent l'efficacité de la transformation,
- les gènes de résistance à la tétracycline (*TetA* et *TetR*) et à la spectinomycine qui ne s'expriment que dans les bactéries,
- un ADN-T limité par les bordures LB et RB, contenant les séquences codantes du gène d'intérêt et du gène marqueur.

Ce plasmide superbinaire est obtenu après recombinaison homologue entre un plasmide accepteur, dérivé du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*, et un plasmide donneur, dérivé de pUC (Messing, 1983).

Les plasmides superbinaires pRec489 et pRec490 ont ainsi été obtenus après recombinaison. Chacun est présent, indépendamment, dans une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* qui a été utilisée pour produire des plantes de maïs transformées avec les gènes *pepc* et *nptII* ou avec les gènes *pepc* et *bar*, respectivement.

La technique de transformation par *Agrobacterium tumefaciens* permet l'intégration du seul ADN-T constitué du gène d'intérêt et du gène marqueur de sélection, encadrés des bordures droite (RB) et gauche (LB).

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.

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

La région envisagée pour l'insertion est l'ADN-T encadré par les bordures droite (RB) et gauche (LB) du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* comprenant le gène d'intérêt et le gène marqueur de sélection. Cette région a une taille de 8 500 paires de bases (pb) environ.

Le gène d'intérêt est constitué du promoteur de PEPC (1 500 pb) et du gène de PEPC (3 000 pb) provenant du sorgho et du terminateur nos (300 pb) provenant d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Le gène de sélection est constitué du promoteur de l'actine du riz (1 400 pb) associé, selon les événements de transformation, au gène *nptII* (1 000 pb) provenant de *E. coli* ou au gène *bar* provenant de *Streptomyces hygroscopicus* (600 pb). Ces gènes sont complétés par le terminateur nos (300 pb) provenant d'*Agrobacterium tumefaciens*. Le gène de sélection est encadré par les séquences terminales inversées de l'élément *Ds* du maïs (350 pb environ).

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 transgéniques de maïs faisant l'objet de cette demande d'autorisation d'essais au champ présentent une activité PEPC plus élevée que celle des plantes de même origine génétique qui ont été utilisées pour la transformation. Elles présentent une résistance au stress hydrique plus élevée que celles des plantes de maïs dont elles sont issues. Selon les événements de transformation, elles sont résistantes à la phosphinothricine (ou glufosinate) ou à la kanamycine. Ces produits et les gènes de résistance correspondants ont été utilisés uniquement pour la sélection des plantes au cours des étapes de culture *in vitro*.

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

#### **D.2.a Taille et structure de l'insert et méthodes utilisées pour sa caractérisation**

Les séquences réellement transférées ont été recherchées par analyse Southern sur des plantes de seconde génération. La caractérisation des événements de transformation a été réalisée en utilisant différentes sondes moléculaires permettant de démontrer l'insertion dans le génome de la plante des deux gènes : gène d'intérêt et gène de sélection. Cette caractérisation a permis de montrer que les gènes ont été intégrés de façon stable. Des analyses par PCR ont permis de montrer au cours des générations suivantes la conservation de l'insertion.

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

### **D.3 Informations concernant l'expression de l'insert**

L'expression de l'insert peut être mise en évidence par analyse moléculaire ou biochimique ainsi que par l'observation du phénotype de tolérance à la phosphinothricine (ou glufosinate) ou à la kanamycine. L'expression du gène PEPC placé sous le contrôle du promoteur du gène de PEPC spécifique des cellules du mésophylle a lieu au niveau des feuilles. Cette expression peut être mise en évidence par une analyse protéique du type Western sur les feuilles des plantes transformées, avec un anticorps spécifique de la protéine PEPC de sorgho.

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

### D.4. a) Mode / vitesse de reproduction

Le mode de reproduction des plantes transgéniques n'est pas modifié par l'expression du transgène. Le gène introduit ne conduit à aucune fonction nouvelle dans la plante puisqu'il existe, dans le maïs, un ou plusieurs gènes codant pour une protéine équivalente à PEPC.

Les différentes générations de transformants cultivées en serre présentaient une fertilité et un cycle de reproduction semblables à ceux de plantes de maïs non transgéniques.

### D. 4. b) Dissémination

Les capacités de dissémination des plantes ne semblent pas être affectées par la modification. Aucune différence de comportement par rapport à la lignée d'origine n'a été mise en évidence pour les différentes générations déjà cultivées en serre et au champ (production de pollen, précocité, morphologie de l'épi ...) qui pourrait avoir un effet sur les capacités de dissémination.

### D. 4. c) Capacité de survie

Cette capacité de survie ne semble pas devoir être affectée : la tolérance à la phosphinothricine (ou glufosinate) ou à la kanamycine, conférée aux plantes transgéniques, ne présente pas d'avantage sélectif en dehors des pressions de sélection qui pourraient être induites par l'application de l'herbicide ou de l'antibiotique. Ces produits, herbicide total et antibiotique, n'étant pas utilisés sur les cultures en général et sur les cultures de maïs en particulier, les plantes faisant l'objet de ce dossier ne présenteront donc pas d'avantage par rapport aux variétés conventionnelles. La sur-expression de la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) ne semble pas devoir modifier cette capacité de survie.

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

Des analyses moléculaires et génétiques de transformants obtenus par la technique de transformation par *Agrobacterium tumefaciens* ont montré que l'intégration de l'ADN-T dans le génome de la plante est stable et que le transgène présente une expression et une héritabilité stables (Hiei *et al.*, 1994, Ishida *et al.*, 1996).

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

Les études menées jusqu'à présent n'ont pas permis de mettre en évidence un transfert de gène dans la nature entre bactéries et eucaryotes. Cependant, un certain nombre de résultats indirects suggèrent que des transferts horizontaux d'ADN eucaryotes vers les bactéries aient pu survenir dans le passé. Ces résultats sont fondés sur des homologues de séquences peptidiques entre les produits de certains gènes bactériens et ceux de gènes eucaryotes correspondants. Ces études ont toutefois des limites liées à la méthodologie (analyse de fragments de gènes incomplets) et surtout à l'interprétation. Il est souvent difficile de faire la

distinction entre un transfert horizontal de gènes et la duplication ancienne de gènes suivie de divergence par accumulation de mutations ou recombinaisons (Berche, 1998).

Il est supposé que les plantes transgéniques porteuses de gènes de résistance d'origine bactérienne libèrent ceux-ci dans le sol, et pourraient ensuite rendre résistantes les bactéries du sol. On sait que l'ADN est rapidement dégradé dans le sol, mais des fragments d'ADN sont capables de demeurer intacts pendant des mois, en particulier au contact de particules minérales telles que celles qui constituent l'argile. Les bactéries du sol pourraient donc capter cet ADN par transformation et l'intégrer dans leur génome (Berche, 1998). Parmi les très nombreuses espèces du sol, peu d'entre elles sont transformables, c'est-à-dire capables d'absorber de l'ADN exogène. Ce sont, notamment, des souches d'*Azotobacter ssp.*, de *Bacillus spp.*, de *Pseudomonas ssp.* ou d'*Acinetobacter spp.* (Lorentz *et al.*, 1994).

Les auteurs s'accordent (Heinemann et Traavik, 2004) pour estimer la fréquence de transfert horizontal plante-bactérie inférieure à  $10^{-17}$  qui se trouve en fait être la limite de détection pour un tel événement, avec les techniques actuelles. Des expériences recherchant le transfert horizontal de gènes de résistance dans des sols où sont cultivées des plantes transgéniques ont été réalisées avec la betterave pour le gène *nptIII* (Smalla *et al.*, 1994 ; Smalla, 1995) et avec le tabac pour le gène *aph(4)* de résistance à l'hygromycine (Becker *et al.*, 1994). Aucune bactérie du sol, sur des milliers de souches étudiées ne portait de gène de résistance des plantes cultivées.

En utilisant un système biologique conçu pour leur étude, Kay *et al.* (2002) ont pu mettre en évidence, en serre, un transfert rare depuis des plantes de tabac (transformants transplastomiques à 10 000 copies de transgène par cellule environ) vers une bactérie du sol (*Acinetobacter sp.* possédant un plasmide dans lequel ont été introduites des séquences homologues au génome chloroplastique). Ce transfert a été rendu possible grâce à l'intervention d'une bactérie pathogène du tabac (*Ralstonia*). En dehors de ces conditions optimales, aucun transfert n'a pu être mis en évidence. En conditions de champ, ce transfert, à partir de plantes possédant une ou deux copies du transgène est supposé être infiniment plus rare, ce qui expliquerait qu'il n'ait jamais été mis en évidence.

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

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

A ce jour nous ne disposons d'aucune indication sur une toxicité éventuelle pouvant résulter des séquences introduites. La modification génétique confère aux plantes transgéniques une résistance à la phosphinotricine (herbicides Basta<sup>®</sup> et Liberty<sup>®</sup>) ou une résistance à la kanamycine et une meilleure capacité d'assimilation du CO<sub>2</sub> et une meilleure remobilisation des ressources azotées et carbonées vers le grain en conditions de stress hydrique. Les gènes introduits responsables de ces caractères ne présentent pas de risques de toxicité particuliers.

Une étude de Wehrmann *et al.* (1996) a montré que la phosphinotricine acétyltransférase, enzyme codée par le gène *bar* et qui détoxifie la phosphinotricine (principe actif des herbicides Basta<sup>®</sup> et Liberty<sup>®</sup>) 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.

Les études menées dans le cadre de l'homologation de plantes génétiquement modifiées n'ont pas révélé de toxicité particulière associée au gène *nptII* (Fuchs *et al.*, 1993). Un avis émis par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments développe de façon approfondie les raisons de cette absence de toxicité. Il est consultable sur le site suivant : [http://www.afssa.fr/actualites/index.asp?mode=actu&ladate=&id\\_info=4673&id\\_theme=1086](http://www.afssa.fr/actualites/index.asp?mode=actu&ladate=&id_info=4673&id_theme=1086)

Le gène *pepc* introduit provient du sorgho, espèce consommée par l'homme et les animaux, et aucune toxicité particulière n'a été reportée à ce jour. Le maïs possède plusieurs équivalents de ce gène pour lequel aucune toxicité n'est associée.

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

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

#### **D.9 Mécanisme d'interaction entre la plante supérieure génétiquement modifiée et les organismes cibles**

Non applicable

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

Aucune interaction particulière n'est attendue avec des organismes non cibles. La protéine phosphinothricine acétyltransférase (produit du gène *bar*) n'est pas connue pour présenter de toxicité (Wehrmann *et al.*, 1996). La protéine néomycine phosphotransférase (produit du gène *nptII*) n'est pas connue pour présenter de toxicité (Fuchs *et al.*, 1993).

La protéine PEPC présente dans de nombreuses plantes dont le maïs et le sorgho n'est pas connue pour présenter de toxicité. Aucune information ne laisse supposer que la sur-expression de la protéine PEPC de sorgho puisse être associée à une quelconque toxicité.

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

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

Aucune interaction de cet ordre n'est envisagée.

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

Les plantes transgéniques retenues pour cet essai sont identifiables par leur phénotype de résistance à la phosphinotricine (ou glufosinate, matière active des herbicides Basta<sup>®</sup> et Liberty<sup>®</sup>) ou par leur phénotype de résistance à la kanamycine.

Des techniques moléculaires peuvent également être utilisées, telles que la technique de Southern, Western ou l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) sur les séquences introduites. Ces dernières permettent alors une identification fiable des plantes transgéniques portant la construction promoteur PEPC-*pepc* associée à un des deux gènes de sélection (résistance au glufosinate ou la kanamycine).

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

Des essais au champ ont déjà été menés, en 2003, 2004 et 2005, sur des plantes exprimant le gène de PEPC. Les premiers essais concernaient les événements de transformation (dossier B/FR/03.03.04) portant également la résistance au glufosinate. Au cours d'une seconde dissémination en 2005 (dossier B/FR/05.02.03), la construction promoteur *pepc-pepc* était associée à un autre gène marqueur (gène de résistance à la kanamycine).

L'ensemble de ces essais ont permis de mettre en évidence, en conditions de stress hydrique piloté et fort, une augmentation de tolérance des plantes de maïs transgéniques, comparativement aux plantes de même fond génétique mais ne possédant pas le transgène. Les conditions de réalisation de ces essais (surfaces réduites, lieu unique ou nombre de lieux très limité) ne pouvaient conduire à l'évaluation de l'intérêt de la modification étudiée (effet sur le rendement et évaluation de l'économie d'eau).

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

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

Les coordonnées précises des sites d'essai ne sont pas connues au moment de la constitution de ce dossier, seule leur localisation régionale est connue. Plusieurs lieux d'essais sont prévus, dans différentes conditions pédo-climatiques ; ils seront implantés :

- en région Poitou-Charentes, dans une zone de polyculture,
- en région Auvergne, Puy-de-Dôme, aux environs de Clermont-Ferrand, dans une zone de polyculture (maïs, blé, pois, etc),
- en région Midi-Pyrénées, Haute-Garonne, aux environs de Toulouse,
- en région Aquitaine,
- en région Rhône-Alpes.

La surface totale de chacun de ces essais sera d'environ 10 à 15 000 m<sup>2</sup> (bordures agronomiques de maïs non transgéniques et allées comprises) avec une surface maximale de 5 000 m<sup>2</sup> couverte par les plantes transgéniques.

Les coordonnées précises des parcelles d'expérimentation seront fournies au Ministère de l'Agriculture avant l'implantation des essais

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

Les agrosystèmes concernés par l'expérimentation sont dédiés à la polyculture (céréales à paille, tournesol, maïs, ...). Les parcelles envisagées pour la mise en place de ces essais 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 sont pas castrées ou si leurs panicules ne sont pas empochées.

Les parcelles seront situées à proximité de stations d'expérimentation. Les sites d'expérimentation seront dans des zones de polyculture (céréales à paille, maïs, pois...).

Les climats dans les différentes régions de culture sont variables, avec un climat de type océanique pour la région Charente Maritime, Aquitaine et Midi-Pyrénées, un climat continental dans la région Auvergne et un climat de type méditerranéen à tendances continentales pour le sud-est de la France. Le climat océanique se traduit par des hivers doux et des étés relativement frais. Le climat continental se caractérise par des hivers rudes et des étés chauds entrecoupés de pluies orageuses. Le climat méditerranéen est chaud et sec avec de violentes pluies d'automne.

### **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 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 et/ou castration ou mise sous poche des panicules) pour éviter toute dissémination de gènes *via* le pollen à partir des plantes transgéniques en culture.

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

Ces essais seront implantés dans des zones de polyculture, hors de biotope officiellement reconnu ou de zone protégée qui pourraient être affectés par ces expérimentations. Les informations sur ces sites seront contrôlées auprès des DIREN.

## F. INFORMATIONS CONCERNANT LA DISSEMINATION

### F.1. Objectif de la dissémination

L'objectif de la dissémination est d'étudier 6 événements de transformation sur-exprimant le gène PEPC de sorgho et présentant une meilleure adaptation aux conditions climatiques en situation de stress hydrique.

Nous souhaitons étudier les deux rôles possibles de ce gène :

- dans les feuilles, un rôle d'amélioration des performances photosynthétiques par une meilleure assimilation du CO<sub>2</sub> dans les cellules du mésophylle,
- dans le grain, un rôle conduisant à une meilleure re-mobilisation des ressources azotées et carbonées foliaires au moment du remplissage.

Cet essai permettra également de multiplier le matériel végétal pour la poursuite de l'étude au cours des autres campagnes de culture.

Pour évaluer le rôle de ce gène dans la tolérance des plantes à la sécheresse, les plantes transformées vont être cultivées en conditions normales (culture traditionnelle avec irrigation optimale) et en conditions de stress hydrique fort, piloté à l'aide de sondes tensiométriques et capacitatives.

L'observation du comportement des plantes en conditions de stress hydrique devrait contribuer fortement à la confirmation du rôle du gène *pepc* dans les mécanismes de défense de la plante contre ce stress.

Etant donnés les rôles supposés de l'enzyme PEPC, différentes mesures pourront être réalisées en champ sur les plantes transformées et non transformées, telles que :

- hauteur des plantes,
- nombre de feuilles et mesure de la surface foliaire,
- mesure de l'activité photosynthétique
- production grainière, biomasse totale et analyse de composition des grains.

Ce dernier paramètre est le plus important pour valider le rôle du gène *pepc*.

Des prélèvements pourront être effectués sur des feuilles, afin de mesurer l'expression de la protéine par la technique de Western blotting ou par le dosage d'activité enzymatique. Des mesures pourront également être effectuées par la suite sur les grains produits en champ.

Ces études en conditions agronomiques nous permettront de sélectionner, au terme de l'expérimentation, l'évènement de transformation le plus intéressant. Celui-ci pourra alors éventuellement faire l'objet d'un développement et être croisé par la suite avec une lignée à source de transposase active en vue de l'élimination de l'élément Ds contenant le gène marqueur. Ce système d'excision du gène marqueur est décrit dans le dossier B/FR/02.04.02 disponible sur le site [www.agriculture.gouv.fr/OGM/ogm.htm](http://www.agriculture.gouv.fr/OGM/ogm.htm).

Les semences produites au cours de ces essais seront utilisées uniquement à des fins de recherche : analyses de composition, semis des prochaines campagnes d'essais. Ces semences ne seront pas commercialisées ou utilisées à d'autres fins que celles décrites ci-dessus.

Toutes les expérimentations seront 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 2006. Les autres campagnes de culture se dérouleront d'avril à novembre 2007, 2008 et 2009.

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

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

Les semis seront effectués à l'aide d'un semoir mécanique. Les lots de semences seront préparés en laboratoire puis individualisés pour le semis.

Le semoir sera nettoyé sur la parcelle d'essai, le surplus de semences sera récupéré et ramené au laboratoire pour stockage ou destruction par traitement thermique.

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

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

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

La récolte des épis sera soit manuelle soit mécanique. Ces épis seront mis en sacs, les sacs identifiés seront rapatriés dans un site agréé par la Commission du Génie Génétique (site Biogemma ou autre site) où les graines seront conservées jusqu'à leur semis ou analyse. Les semences non utilisées seront détruites par traitement thermique (traitement à la vapeur).

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'essais 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 n'excédera pas 80 000 par site, sur une surface de 5000 m<sup>2</sup> environ, hors bordures et allées.

## **G. INFORMATIONS 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 castrées ou ensachées et n'émettant pas de pollen transgénique, aucune contrainte d'isolement avec d'autres cultures de maïs ne sera mise en œuvre. Cependant, si les plantes étaient laissées en pollinisation libre pour les besoins de l'expérimentation, une distance d'isolement de 200 mètres de toute autre culture de maïs à vocation commerciale sera mise en place.

Quatre rangs de bordure agronomique, constituées de plantes non-transgéniques, seront implantées autour de la parcelle ; selon les besoins de l'expérimentation, il pourra s'agir de lignées ou d'hybrides, fertiles (pollinisateurs) ou mâle-stériles (ne produisant pas de pollen)

En Europe, il n'existe pas d'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. La dissémination de pollen sera ainsi minimisée. De plus, la présence de quatre rangs de bordure agronomique constituée de plantes de même précocité que les plantes transgéniques servira de piège à pollen. En fin d'essai, ces plantes seront broyées sur place puis enfouies par un travail superficiel du sol (ce travail pourra éventuellement être retardé, selon les conditions climatiques et l'état du sol à la récolte).

La préparation des lots de semis est réalisée au laboratoire. Chaque lot de graines est conditionné dans un emballage (sachet de papier couramment utilisé par les sélectionneurs) ouvert uniquement lors du semis, sur la parcelle d'essai.

Après semis, le surplus éventuel de graines présentes dans le semoir 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**

Les bordures non transgéniques de maïs seront détruites par broyage puis enfouissement sur la parcelle lors de la destruction finale de l'essai.

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**

Les épis produits sur cet essai et destinés aux analyses ou à des semis futurs seront récoltés et rapatriés en laboratoire ; les autres plantes et résidus de la culture seront détruits par broyage puis enfouissement sur la parcelle d'essai.

### **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, les techniciens et agronomes. La conformité de l'expérimentation aux conditions décrites dans ce dossier et dans l'autorisation du Ministère de l'Agriculture sera contrôlée par les agents assermentés de la Protection des Végétaux.

Après la destruction de l'essai, plusieurs visites des parcelles seront effectuées 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, vandalisme...). Les méthodes de destruction volontaire seront adaptées au stade de développement des plantes (traitement herbicide à l'aide d'un produit autre que Basta<sup>®</sup> ou Liberty<sup>®</sup> dont la matière active est du glufosinate, broyage éventuel après récolte des débris dispersés,...). Elles seront appliquées dès que possible après la fin des constatations d'usage.

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

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

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

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

Les plantes qui seront cultivées au champ seront résistantes à la phosphinothricine (ou glufosinate) ou à la kanamycine et sur-expriment dans les feuilles la protéine PEPC.

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, celle-ci n'ayant pas d'interaction avec le mode de reproduction de la plante.

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

De même, l'antibiotique utilisé pour le repérage et/ou la sélection des plantes transformées en laboratoire et en serre - kanamycine,- n'est pas utilisé pour des applications sur les cultures. Il sera appliqué éventuellement lors des essais par le dépôt de quelques microlitres de solution au centre du « cornet » dans le but de repérer les plantes porteuses de la modification génétique. En l'absence d'utilisation de ce produit en agriculture 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.

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

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

- la tolérance au glufosinate (herbicides totaux Basta<sup>®</sup> et Liberty<sup>®</sup>), ou la tolérance à la kanamycine
- l'expression de la protéine PEPC de sorgho.

Aucun avantage ou inconvénient sélectif ne semble être conféré à ces plantes, dans les conditions de l'essai, car aucune pression de sélection ne sera appliquée. Il n'y aura pas de traitement par l'herbicide Basta<sup>®</sup> et Liberty<sup>®</sup>, si ce n'est par mouillage de la feuille afin de repérer les plantes transformées. De même, il n'y aura pas de traitement par l'antibiotique kanamycine, si ce n'est par dépôt de quelques microlitres de solution dans le « cornet » des plantes.

Dans ces conditions de traitement par l'herbicide ou par l'antibiotique, aucune plante, qu'elle soit sensible ou résistante, n'est détruite et la pression de sélection est quasi-nulle.

La sur-expression de la protéine PEPC dans les cellules du mésophylle n'est pas de nature à induire de pression de sélection pouvant favoriser ou défavoriser ces plantes.

### **H.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" rend très improbables les possibilités d'obtenir des plantes descendantes d'inter-croisement suite à un flux pollinique. Combiné à l'absence d'avantage sélectif dans les conditions de culture du maïs, ce transfert peut être considéré comme un risque très minime.

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

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

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

Aucune interaction n'est attendue entre le produit du gène *bar* ou du gène *nptII* et des organismes cibles. En l'absence d'application de l'herbicide ou de l'antibiotique sur la parcelle d'essai (hors mouillage ou pulvérisation localisée de la feuille afin de repérer les plantes transgéniques), aucun effet éventuel n'est attendu. Aucune interaction entre la protéine PEPC sur-exprimée dans les feuilles de maïs et des organismes n'est attendue.

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

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

Aucune interaction n'est attendue entre le produit du gène *bar* ou du gène *nptII* et des organismes non-cibles. En l'absence d'application de l'herbicide ou de l'antibiotique sur la parcelle d'essai (hors mouillage de la feuille ou pulvérisation localisée, afin de repérer les plantes transgéniques), aucun effet éventuel n'est attendu. Aucune interaction entre la protéine PEPC sur-exprimée dans les feuilles de maïs et des organismes non-cibles n'est attendue.

### **H.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**

Une étude de Wehrmann *et al.* (1996) a montré que la phosphinotricine acétyltransférase codée par le gène *bar*, 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 études menées dans le cadre de l'homologation de plantes génétiquement modifiées n'ont pas révélé de toxicité particulière associée au gène *nptII* (Fuchs *et al.*, 1993). Un avis émis par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments développe de façon approfondie les raisons de cette absence de toxicité. Il est consultable sur le site suivant : [http://www.afssa.fr/actualites/index.asp ?mode=actu&ladate=&id\\_info=4673&id\\_theme=1086](http://www.afssa.fr/actualites/index.asp ?mode=actu&ladate=&id_info=4673&id_theme=1086)

La protéine PEPC exprimée dans les plantes transformées est issue de la protéine endogène du sorgho. A ce jour, aucune donnée relative à la protéine PEPC de maïs ou de sorgho couramment consommée par les animaux, ne laisse supposer qu'une quelconque toxicité pourrait leur être associée.

### **H.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 H.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, la protéine PEPC existant dans le sorgho et la protéine phosphinotricine acétyl transférase n'étant pas connue pour présenter de toxicité (voir ci-dessus les paragraphes H.5 et H.6).

### **H.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 H.4, H.5 et H.6). Les niveaux d'expression géniques du gène *bar*, 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.

**H.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, en cas de développement commercial de plantes de maïs sur-exprimant la protéine PEPC, il aurait pour effet une amélioration du rendement photosynthétique des plantes de maïs et un meilleur remplissage du grain.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Bailey K.J., Battistelli A., Dever L.V., Lea P.J. and Leegood R.C. (2000)** Control of C<sub>4</sub> photosynthesis : effects of reduced activities of phosphoenolpyruvate carboxylase on CO<sub>2</sub> assimilation in *Amaranthus edulis* L., *Journal of Experimental Botany*, **51** : 339-346.
  
- **Becker J., Sieger H., Logemann J. und Schell J. (1994)** Begleitende sicherheitsforschung zur freisetzung gentechnisch veränderter petunian, Basel : Bundesministerium für Forschung und Technologie. In : *Biologische Sicherheit, Forschung Biotechnologie*, 563-578.
  
- **Berche P. (1998)** Les plantes transgéniques et la résistance aux antibiotiques. *Médecine et Thérapeutique*, **4** : 709-718.
  
- **Boyer J.S. (1970)** Leaf enlargement and metabolic rate in corn, soybean and sunflower at various leaf water potentials, *Plant Physiology*, **46** : 233-235.
  
- **Cornic G. (2000)** Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture, not by affecting ATP synthesis, *Trends in Plant Science*, **5(5)** : 187-188.
  
- **Davies J. and Smith DI. (1978)** Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Ann. Rev. Microbiol.*, **32** : 469-518.
  
- **Ephrath J.E. and Hesketh (1991)** The effects of drought stress on leaf elongation, photosynthesis and transpiration rate in maize (*Zea mays* L.) leaves, *Photosynthetica*, **25** : 607-619.
  
- **Fuchs R., Ream J., Hammond B., Naylor M., Leimgruber R., and Berberich S. (1993)** Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. *Bio/technology*, **11**: 1543-1547.
  
- **Hiei Y., Ohta S., Komari T. and Kumashiro T. (1994)** Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the ADN-T. *The Plant Journal*, **6** : 271-282.
  
- **Heinemann J. et Traavik T. (2004)** Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants. *Nature Biotech*, **22** : 1105-1119.
  
- **Ishida Y., Saito H., Ohta S., Hie Y., Komari T., Kumashiro T. (1996)** High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology*, **14** : 745-750.
  
- **Jeanneau M. (2001)** Sur-expression de la phosphoenol pyruvate carboxylase chez le maïs : impact sur le fonctionnement photosynthétique et la qualité du grain. Thèse Université Paris XI Orsay.

- **Kay E., Vogel T., Bertolla F., Nalin R. et Simonet P. (2002)** In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Applied Environ. Microbiol.*, **68**: 3345-3351.
- **Lorentz M.G. and Wackernagel W. (1994)** Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiology Rev.*, **58** : 563-602.
- **Messing J. (1983)** New M13 vectors for cloning. *Methods in enzymology*, **101** : 20-78.
- **Robelin M. (1984)** Fonctionnement hydrique et adaptation à la sécheresse, *Physiologie du Maïs*, Colloque de Royan (15 au 17 mars 1983), ed. INRA : 445-476.
- **Smalla K.F., Gebhard J.D., van Elsas A. and Schiemann M. (1994)** Bacterial communities influenced by transgenic plants. In Jones D.D., ed. *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> international symposium on the biosafety results of fields tests of genetically modified plants and microorganisms*, Oakland : University of California, 157-167.
- **Smalla K.F. (1995)** Horizontal gene transfer from transgenic plants into plant associated microorganisms and soil microorganisms. In *safety of transgenic crops, Environmental and agricultural considerations*, Basel : BATS, 29-34.
- **Suzuki I., Cretin C., Omata T. and Sugiyama T. (1994)** Transcriptional and post-transcriptional regulation of nitrogen-responding expression of phosphoenolpyruvate carboxylase gene in maize, *Plant Physiology*, **105** : 1223-1229.
- **Tezara W., Mitchell V.J., Driscoll S.D. and Lawlor D.W. (1999)** Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP, *Nature*, **401** : 914-917.
- **Von Caemmerer S. and Furbank R.T. (1998)** Modelling C<sub>4</sub> photosynthesis, in Sage RF, Monson RK, eds *C<sub>4</sub> Plant Biology*, New York Academy Press, 173-211.
- **Wehrmann A., van Vliet A., Opsomer C., Botterman J. and Schulz A. (1996)** The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology*, **14** : 1274-1275.