

Demande d'autorisation auprès du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
Essais au champ de maïs génétiquement modifiés pour le caractère de précocité de floraison

SOCIETE BIOGEMMA



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

**Essais au champ de maïs génétiquement modifiés pour le
caractère de précocité de floraison**
(demande pluriannuelle)

Dossier B/FR/06.12.05

BIOGEMMA
5, rue Saint-Germain-l'Auxerrois
75001 PARIS
Novembre 2006

SOMMAIRE

Résumé des points principaux	7
Introduction	9
A. Informations d'ordre général	12
A.1 Nom et adresse du notifiant	12
A.2 Nom, qualification et expérience des scientifiques responsables	12
A.3. Titre du projet	12
A.4. Développements ultérieurs envisagés	12
B. Informations concernant les plantes réceptrices	13
B.1 Nom complet	13
B.2.a Informations concernant la reproduction	13
B.2.b Compatibilité sexuelle avec d'autres espèces sauvages ou cultivées	13
B.3 Capacité de survie	14
B.4 Dissémination	14
B.5 Distribution géographique de la plante	14
B.6 Description de l'habitat naturel de la plante (espèces ne poussant pas habituellement en UE)	14
B.7 Autres interactions potentielles avec des organismes dans l'écosystème habituel	15
C. Informations concernant la modification génétique	16
C.1 Description des méthodes utilisées pour la modification génétique	16
C.2 Nature et source du vecteur utilisé	16
C.3 Taille, origine des organismes donneurs et fonction recherchée de chaque fragment constitutif de la région envisagée pour l'insertion	17
D. Informations concernant la plante supérieure génétiquement modifiée	18
D.1 Description du ou des caractères ou des caractéristiques qui ont été introduits ou modifiés	18
D.2 Informations sur les séquences réellement insérées ou délétées	18
D.3 Informations concernant l'expression de l'insert	18
D.4 Description des différences entre la plante génétiquement modifiée et la plante réceptrice	19
D.5 Stabilité génétique de l'insert et stabilité phénotypique de la plante modifiée	19
D.6 Modifications de la capacité de la plante modifiée à transférer du matériel génétique dans d'autres organismes	19
D.7 Informations concernant les effets toxiques, allergisants ou autres effets nocifs résultants de la modification génétique sur la santé humaine	20
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	21
D.9 Mécanisme d'interaction entre la plante modifiée et les organismes cibles	21
D.10 Modifications potentielles des interactions de la plante modifiée avec les organismes non-cibles résultant de la modification génétique	21
D.11 Interactions potentielles avec l'environnement abiotique	22

D.12 Description des méthodes de détection et d'identification de la plante supérieure génétiquement modifiée	22
D.13 Informations, le cas échéant, sur les précédentes disséminations de la plante génétiquement modifiée	22
E. Informations concernant le site de dissémination	23
E.1 Localisation et étendue des sites de dissémination	23
E.2 Description de l'écosystème des sites de dissémination	23
E.3 Présence d'espèces apparentées sauvages sexuellement compatibles ou d'espèces végétales cultivées sexuellement compatibles	23
E.4 Proximité des sites de biotopes officiellement reconnus ou de zones protégées susceptibles d'être affectées	23
F. Information concernant la dissémination	24
F.1 Objectif de la dissémination	24
F.2 Date et durée prévues de l'opération	24
F.3 Méthode de dissémination envisagée	24
F.4 Méthode de préparation et gestion du site avant, pendant et après la dissémination, y compris les pratiques culturales et méthodes de récolte	25
F.5 Nombre approximatif de plantes	25
G. Information sur les plans de surveillance, de contrôle et de traitement du site et des déchets après dissémination	26
G.1 Précautions prises	26
G.2 Description des méthodes de traitement du site après dissémination	26
G.3 Description des méthodes de traitement après dissémination pour le matériel issu de plantes génétiquement modifiées, y compris les déchets	27
G.4 Description des plans et techniques de surveillance	27
G.5 Description des plans d'urgence	27
G.6 Méthodes et procédures de protection du site	27
H. Conclusions concernant les incidences potentielles sur l'environnement de la dissémination	28
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	28
H.2. Avantages ou inconvénients sélectifs conférés aux plante modifiées	28
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	29
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	29
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	29

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	30
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	30
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	31
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	31
I. Références bibliographiques	32

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'une autorisation délivrée en 2006.

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

La précocité de floraison joue un rôle majeur dans l'adaptation des plantes à l'environnement et conditionne directement la zone de culture possible des variétés de nombreuses espèces cultivées. Ainsi dans le cas du maïs, et sur le seul territoire français, les variétés de maïs sont réparties en sept groupes de précocité qui correspondent à des durées de cycle entre germination et maturation du grain et qui, pratiquement, déterminent les zones où ces variétés peuvent être cultivées.

Ce critère qui conditionne donc les possibilités de culture de la variété, influe sur les dates de semis, floraison, date de récolte. Il va également influencer sur la qualité des produits récoltés. Ainsi, la teneur en humidité du grain à la récolte est associée à la précocité. De plus, certains types particuliers de maïs, ayant des qualités de grain particulières : denté, waxy ou plata, par exemple, dont les utilisations sont spécifiques et exclusives ne peuvent être cultivées que dans des zones strictes de précocité et de climat. Enfin, le potentiel de production de la plante est fortement lié au caractère de précocité, qui définit une durée du cycle reproductif. Ainsi les variétés cultivées dans le Sud-ouest ont un rendement grainier moyen qui dépasse de 50% celui de variétés cultivées dans le Nord-est.

La précocité est dépendante de la durée de différentes étapes physiologiques du développement de la plante : mise en place du système végétatif, reproducteur, durée de remplissage puis de maturation du grain. Les gènes impliqués dans le déterminisme du caractère de floraison sont classés en fonction de leur effet dans la voie de régulation : certains vont moduler l'effet de la lumière (quantité, qualité, photopériode, ...), d'autres jouent sur l'effet de la température (comme lors de la vernalisation, processus absent chez le maïs), d'autres dans une voie dite autonome (propre à la plante), les derniers enfin dans une voie impliquant une hormone : l'acide gibbérellique. L'identification des gènes qui sous-tendent ces différentes étapes et la connaissance de leur interaction avec des facteurs environnementaux – et notamment des conditions de température limitantes - présente un intérêt majeur qui permettrait d'orienter de façon plus efficace la sélection de variétés adaptées aux caractéristiques environnementales d'Europe du Nord.

Depuis les années 80, l'utilisation des « sommes de températures » a été utilisée comme un moyen pratique et sûr de description des différences de précocité des variétés de maïs et de leur adaptation aux différentes zones de culture. Les sommes de températures sont définies comme le cumul des degrés-jours du lieu de culture (températures moyennes journalières – 6°C, température quotidienne maximum limitée à 30°C) entre la date de semis et la maturité physiologique du grain. Le tableau suivant représente les classes de degrés-jours pour les sept groupes de précocité des variétés de maïs cultivés en France.

	Besoins en degrés-jours du semis à la floraison	Classes de degrés-jours du semis à une teneur en eau du grain de			
		30 %	32 %	35 %	38 %
Grain Très Précocé	 790 à 835	< 1720	< 1700	< 1620	< 1560
Grain Précocé	 825 à 870	1720 à 1780	1680 à 1740	1620 à 1680	1560 à 1620
Grain Demi-Précocé C1	 850 à 930	1780 à 1840	1740 à 1800	1680 à 1740	1620 à 1680
Grain Demi-Précocé C2	 920 à 975	1840 à 1910	1800 à 1870	1740 à 1810	1680 à 1750
Grain Demi-tardif	 975 à 1020	1910 à 1980	1870 à 1940	1810 à 1880	1750 à 1820
Grain Tardif	 1005 à 1050	1980 à 2055	1940 à 2015	1880 à 1955	1820 à 1895
Grain Très tardif	 1040 à 1070	2055 à 2130	2015 à 2090	1955 à 2030	1895 à 1970

La compréhension de la précocité a souvent été focalisée sur la précocité de floraison qui apparaît comme un facteur principal d'adaptation aux conditions d'environnement. En effet des études génétiques destinées à repérer des QTLs (Quantitative Trait Loci) de productivité du maïs ont surtout mis en évidence des QTLs de précocité de floraison.

Des avancées importantes ont été obtenues sur l'étude génétique du caractère de précocité de floraison chez *Arabidopsis thaliana* et plus récemment chez le riz. Plusieurs grandes voies physiologiques contrôlant la précocité de floraison ont pu être identifiées ainsi que plusieurs dizaines de gènes jouant un rôle déterminant dans ces phénomènes (Blazquez 2000). Les travaux en cours sur cette espèce portent sur l'identification de nouveaux gènes et sur une meilleure compréhension des interactions entre gènes et facteurs environnementaux avec une focalisation particulière sur l'effet de la température (Blazquez *et al.* 2003).

De façon générale, les travaux publiés sur ce sujet soulignent une conservation importante des mécanismes en cause. De nombreux QTLs ont pu être mis en évidence chez le riz, le blé et le maïs où certaines zones chromosomiques semblent avoir un effet déterminant. Dans le cas du riz, la connaissance de trois QTLs ont conduit à des clonages de gènes correspondant à des gènes jouant un rôle central chez *Arabidopsis* : *Hd1* correspondant au gène *Constans* (Yano *et al.* 2000) et *HD3a* correspondant au gène *FT* (Kojima *et al.* 2002). Le troisième gène cloné, *HD6*, d'effet moins important, correspond à une protéine kinase (Takahashi *et al.* 2001), dont le rôle dans la floraison n'avait pas été établi chez *Arabidopsis*. Ainsi, le déterminisme de la précocité apparaît largement conservé entre ces deux espèces, à l'exception notable des gènes liés à la vernalisation, qui semblent absents du génome du riz (Izawa *et al.* 2003). Enfin, *Arabidopsis* et le riz, comme les maïs tropicaux, sont sensibles à la durée du jour, ces espèces étant à l'origine adaptées aux jours longs pour *Arabidopsis* et aux jours courts pour le riz.

Le nombre de QTL pour lesquels un gène a pu être identifié reste toutefois minime chez ces deux espèces. Des études de génomique, menées à partir de données acquises sur des espèces-modèles, ont conduit à identifier certains gènes-candidats dont l'expression semble affecter la précocité de floraison (Danilevskaya *et al.*, 2003).

Dans le cas du maïs, où de très nombreux QTLs impliqués dans la précocité de floraison ont été identifiés, une mutation tardive, *Id1*, a conduit au clonage d'un gène (Colasanti *et al.* 1998), et un QTL majeur, *vgt1*, aurait été cloné par une approche positionnelle (Salvi *et al.* 2002). La contribution du polymorphisme du gène *dwarf8* (homologue du gène d'*Arabidopsis* *GAI*) à la variation de précocité de floraison a également été mise en évidence par Thornsberry *et al.* en 2001.

A partir de données génétiques et d'études d'expression de gènes dans des phases physiologiques particulières du maïs (par exemple au cours de la transition apicale de la phase végétative vers la phase reproductive) complétées par une approche de bioanalyse, différentes séquences ont pu être isolées. Ces séquences ont ensuite été co-localisées sur les QTLs précédemment identifiés et certains gènes ont été retenus pour faire l'objet d'une validation fonctionnelle.

A terme, la meilleure compréhension du phénomène de précocité de floraison, peut conduire à son exploitation pour une meilleure adaptation des variétés aux climats européens et *in fine* un rendement et une qualité accrus. Elle peut aussi permettre d'exploiter de nouvelles ressources génétiques, comme les maïs d'origine tropicale, dont la floraison en jours courts intervient trop tardivement en Europe. Selon les gènes et leur impact, l'utilisation des connaissances acquises passera par des marqueurs moléculaires (« Sélection Assistée par Marqueurs ») ou par transgénèse.

Parmi les gènes influant sur le caractère de précocité de floraison, il existe de nombreux facteurs de transcription spécifiques de séquences particulières, localisées en amont du site de démarrage de transcription. Ces facteurs de transcription codent pour des protéines, de caractéristiques structurales communes, possédant généralement au moins deux domaines : un domaine de fixation à l'ADN et un domaine d'action sur la transcription. Un troisième domaine qui permet d'associer un autre élément leur est parfois associé. L'expression des facteurs de transcription régule ainsi directement, ou en association avec d'autres facteurs ou d'autres éléments, l'activité de certains gènes qui peuvent être impliqués dans des phénomènes complexes tels que le caractère de précocité de floraison.

Nous avons engagé des études sur plusieurs facteurs de transcription isolés à la suite de convergence d'information de génétique, d'expression et de bioanalyse de séquences nucléotidiques. Quatre facteurs ont un effet sur la voie modulant l'effet de la lumière et pour un cinquième a un effet sur une voie particulière non connue à ce jour. Nous avons entrepris la validation fonctionnelle de ces facteurs ; elle consiste à ré-introduire dans le maïs des séquences des facteurs supposés impliqués dans la précocité de floraison, sous contrôle d'un promoteur fort ou dans une stratégie d'inhibition RNAi. L'effet de la sur-expression ou de la sous-expression de ces facteurs dans la plante, permet de conclure sur leur rôle supposé. Dans une première phase d'évaluation, en serre, l'impact de la modification de l'expression des gènes-candidats sur la floraison a été observée.

Dans une seconde phase, au cours d'essais au champ, nous souhaitons confirmer, en situation agronomique et donc d'interaction forte avec le pédo-climat, les résultats observés en serre. Les observations porteront essentiellement sur la phase végétative, sur la phase de floraison (floraison mâle et femelle) et sur la phase de maturation du grain. Ces expérimentations pourront également initier des mesures de rendement et de qualité du grain récolté en situation de culture normale du maïs.

Une autorisation d'expérimenter a été obtenue en 2006 (dossier B/FR/06.02.03) mais les essais ont été détruits par acte de vandalisme et il n'a pas été possible de recueillir les informations attendues.

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

Essais au champ de maïs génétiquement modifiés pour le caractère de précocité de floraison.
--

A.4. Développements ultérieurs envisagés

Ces événements de transformation font l'objet d'une évaluation dans le cadre d'une approche de validation fonctionnelle destinée à compléter les connaissances scientifiques. Il s'agit de confirmer le rôle des gènes étudiés dans le caractère de précocité de floraison. 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^{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*, 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 des gènes étudiés, d'un gène marqueur et, dans certaines constructions, d'un gène rapporteur.

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 pRec903, 937, 938, 939 et pRecL246/10 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 chacun des cinq gènes du maïs codant pour des facteurs de transcription associés au marqueur de sélection *bar*, et, pour les quatre premiers plasmides, au gène rapporteur GFP (Green Fluorescent Protein, Steward, 2001).

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 9 500 paires de bases (pb) environ pour les plasmides pRec 903, 937, 938 et 939 et de 5 000 pb pour le plasmide pRec L546/10.

pRec 903 (de la bordure gauche vers la bordure droite) :

terminateur de polygalacturonase d' <i>A. thaliana</i>	500 pb
séquence du facteur de transcription 1 du maïs	300 pb
intron de la tubuline de riz	1 000 pb
séquence du facteur de transcription 1 du maïs	300 pb
promoteur actine et intron du riz	1 400 pb
élément Ds du maïs	500 pb
terminateur 3' de la nopaline synthase d' <i>A. tumefaciens</i>	250 pb
Green Fluorescent protein GFP d' <i>Aequoria victoria</i>	750 pb
intron de la FAD désaturase oméga 6 d' <i>A. thaliana</i>	1 200 pb
promoteur CsVMV	600 pb
terminateur 3' de la nopaline synthase d' <i>A. tumefaciens</i>	250 pb
partie codante <i>bar</i> de <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	600 pb
promoteur actine et intron du riz	1 400 pb
élément Ds du maïs	500 pb

pRec 937 (de la bordure gauche vers la bordure droite) :

séquences et tailles identiques à celles de pRec903, mais les séquences de la structure RNAi sont celles d'un second facteur de transcription.

pRec 938 (de la bordure gauche vers la bordure droite) :

séquences et tailles identiques à celles de pRec903, mais les séquences de la structure RNAi sont celles d'un troisième facteur de transcription.

pRec 939 (de la bordure gauche vers la bordure droite) :

séquences et tailles identiques à celles de pRec903, mais les séquences de la structure RNAi sont celles d'un quatrième facteur de transcription.

pRec L546/10 (de la bordure gauche vers la bordure droite) :

promoteur CsVMV	600 pb
facteur de transcription 5 du maïs	2 400 pb
terminateur 3' du CaMV	300 pb
promoteur actine et intron du riz	1 400 pb
partie codante <i>bar</i> de <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	600 pb
terminateur 3' de la nopaline synthase d' <i>A. tumefaciens</i>	250 pb

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 un caractère de précocité de floraison modifié par rapport à celui des plantes non-transgéniques, de même origine génétique, dont elles dérivent. Cette modification de floraison a été obtenue par la sur-expression ou la sous-expression de cinq gènes différents du maïs dont la fonction supposée est d'agir comme facteur de transcription.

Tous les événements de transformation sont résistants à la phosphinothricine (ou glufosinate). Ce produit et le gène de résistance correspondant ont été utilisés uniquement pour la sélection des plantes au cours des étapes de culture *in vitro*. Les événements qui font l'objet de sous-expression expriment également la Green Fluorescent Protein (GFP), gène rapporteur qui permet de repérer les plantes transgéniques dont l'ADN-T est exprimé.

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 première 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 de l'ADN-T et des différentes séquences : séquence d'intérêt, gène rapporteur 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 ainsi que par l'observation du phénotype de tolérance à la phosphinothricine (ou glufosinate) et/ou l'expression du gène GFP placé sous le contrôle du promoteur CsVMV. Cette expression peut être mise en évidence par observation sous microscope à fluorescence de fragments de tissus des plantes transgéniques.

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. Les gènes sur-exprimés ou sous-exprimés ne conduisent à aucune fonction physiologique nouvelle dans la plante ; les observations phénotypiques faites en serre ont mis en évidence la modification recherchée de la date de floraison de ces plantes.

Les différentes générations de transformants cultivées en serre présentaient une fertilité semblable à celle de plantes de maïs non transgéniques. La durée du cycle de reproduction est modifiée de quelques jours.

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 (production de pollen, nombre de grains produits par 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), 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. Ce produit, herbicide total, n'étant pas utilisé 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- ou sous-expression des gènes étudiés qui conduisent uniquement à une modification de la précocité de floraison ne semble pas devoir modifier de façon significative 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 *nptII* (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[®] et Liberty[®]) ; elle conduit à une expression de la protéine GFP et à une modification du niveau d'expression de cinq gènes différents du maïs.

La protéine GFP, couramment utilisée comme gène rapporteur dans le but de produire des protéines de fusion, n'est pas connue pour être toxique ou allergène (Richards *et al.*

2003). Elle a été exprimée dans de très nombreux types cellulaires (bactéries, plantes, animaux) sans effet toxique observé. Elle est rapidement dégradée dans un milieu simulant la digestion gastrique.

Une étude de Wehrmann *et al.* (1996) a montré que la phosphinothricine acétyltransférase, enzyme codée par le gène *bar* et qui détoxifie la phosphinothricine (principe actif des herbicides Basta[®] et Liberty[®]) 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 différents gènes étudiés sont des gènes du maïs qui ne sont pas connus pour présenter de toxicité. Quatre gènes sur les cinq étudiés ont une expression réduite par rapport à leur niveau d'expression normale dans les plantes de maïs ; un seul est sur-exprimé. De façon générale, aucune toxicité particulière n'a été rapportée à ce jour pour le maïs.

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 GFP, couramment utilisée comme gène rapporteur dans le but de produire des protéines de fusion, n'est pas connue pour être toxique ou allergène (Richards *et al.* 2003). Elle a été exprimée dans de très nombreux types cellulaires (bactéries, plantes, animaux) sans effet toxique observé.

Les gènes de maïs sur- ou sous-exprimés ne sont pas connus pour présenter de toxicité ou d'interactions particulières avec les organismes non-cibles.

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[®] et Liberty[®]) ou par l'expression de la protéine GFP.

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 les constructions décrites dans ce dossier et associées au gène de sélection (résistance au glufosinate) et/ou au gène rapporteur GFP.

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

Il s'agit de la seconde dissémination pour les plantes qui expriment ces différentes constructions génétiques. Une autorisation d'expérimenter a été obtenue en 2006 (dossier B/FR/06.02.03) mais les essais ont été détruits par acte de vandalisme et il n'a pas été possible de recueillir les informations attendues.

E. INFORMATIONS CONCERNANT LE SITE DE DISSEMINATION

E.1 Localisation et étendue des sites de dissémination

Plusieurs lieux d'essais sont prévus, dans différentes conditions pédologiques ; ils seront implantés en région Auvergne, Puy-de-Dôme, sur la commune de 63510 Malintrat, aux environs de Clermont-Ferrand, dans une zone de polyculture (maïs, blé, pois, etc).

La surface totale de chacun de ces essais sera d'environ 5 000 m² (bordures agronomiques de maïs non transgéniques et allées comprises) avec une surface maximale de 1 500 m² couverte par les plantes transgéniques.

Les coordonnées de la parcelle d'expérimentation sont données dans la fiche confidentielle de localisation qui est fournie au Ministère de l'Agriculture.

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...).

Le climat dans la région de culture est de type climat continental et se caractérise par des hivers rudes et des étés chauds entrecoupés de pluies orageuses.

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.

F. INFORMATIONS CONCERNANT LA DISSEMINATION

F.1. Objectif de la dissémination

L'objectif de la dissémination est d'étudier 13 événements de transformation sur- ou sous-exprimant différents gènes de maïs dont le rôle supposé est de modifier la précocité de floraison.

Nous souhaitons confirmer l'implication possible de ces gènes dans le caractère de précocité de floraison, en situation pédo-climatique classique pour la culture du maïs. Les éventuels effets pléiotropiques de la modification de l'expression seront simultanément observés.

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

L'observation du comportement des plantes et notamment des différentes phases physiologiques : période végétative, transition florale, date de floraison mâle et femelle, biomasse produite et paramètres du rendement grainier doit permettre de conclure sur le rôle de ces séquences et sur leur utilisation possible dans des processus de sélection.

Des prélèvements pourront être effectués sur des feuilles, afin de contrôler les niveaux d'expression du gène rapporteur par observation sous microscope à fluorescence ou par des techniques de RT-PCR. Des mesures pourront également être effectuées par la suite sur le matériel produit au champ et notamment sur les grains récoltés.

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 2007. Les autres campagnes de culture se dérouleront d'avril à novembre 2008, 2009 et 2010.

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 ou manuellement à l'aide d'une canne de semis. 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 manuelle. 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 7 500 par site, sur une surface de 1 500 m² 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, constitués 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 des transgènes à partir des essais et via le pollen transgénique sont très réduits puisque les plantes de la parcelle d'expérimentation ne produiront ou ne diffuseront 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® ou Liberty® dont la matière active est le 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) et sous-expriment ou sur-expriment un facteur de transcription du maïs et, pour certaines d'entre elles la protéine GFP.

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 cm² de chaque plante ou en pulvérisation dirigée, dans le but de repérer les plantes porteuses de la modification génétique. En l'absence d'utilisation de 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.

Le gène rapporteur GFP utilisé dans quatre des cinq constructions génétiques introduites dans le maïs n'est pas connu pour présenter de toxicité ou d'allergénicité. Les plantes exprimant cette protéine ne semblent pas pouvoir présenter d'avantage et devenir plus persistantes.

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

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

- la tolérance au glufosinate (herbicides totaux Basta[®] et Liberty[®]),
- l'expression de la protéine GFP,
- la sur- ou la sous-expression de gènes de maïs (facteurs de transcription).

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[®] et Liberty[®], si ce n'est par mouillage de la feuille afin de repérer les plantes transformées.

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

La sur- ou la sous-expression des facteurs de transcription endogène ainsi que l'expression de la protéine GFP dans les cellules du maïs 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'un éventuel intercroisement 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* et des organismes cibles. En l'absence d'application de l'herbicide sur la parcelle d'essai (hors mouillage de la feuille afin de repérer les plantes transgéniques), aucun effet éventuel n'est attendu. Aucune interaction entre les facteurs de transcription du maïs sur- ou sous-exprimés, qui ont vocation à influencer sur la régulation de différents gènes, et d'autres organismes n'est attendue. De même aucune interaction entre la GFP et d'autres 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* et des organismes non-cibles. En l'absence d'application de l'herbicide sur la parcelle d'essai (hors mouillage de la feuille afin de repérer les plantes transgéniques), aucun effet éventuel n'est attendu. Aucune interaction entre la protéine GFP, les facteurs de transcription ou le produit du gène *bar* 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 de toxicologie menées sur la protéine GFP exprimée dans des plantes n'ont pas révélé de toxicité particulière. Cette protéine, ingérée par des rats, n'a pas affectée la croissance, les quantités de nourriture ingérées, le poids de différents organes ou l'activité sérique d'enzymes hépatiques. Elle ne semble pas présenter d'épitope pouvant conduire à une allergénicité et elle est rapidement dégradée dans un liquide simulant la digestion (Richards *et al.* 2003).

Les facteurs de transcription sur- ou sous-exprimés proviennent du maïs et sont donc couramment consommés par l'Homme ou l'animal. A ce jour, aucune donnée relative à ces protéines de maïs 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.

Les études de toxicologie menées sur la protéine GFP exprimée dans des plantes n'ont pas révélé de toxicité particulière. Cette protéine, ingérée par des rats, n'a pas affectée la croissance, les quantités de nourriture ingérées, le poids de différents organes ou l'activité sérique d'enzymes hépatiques. Elle ne semble pas présenter d'épitope pouvant conduire à une allergénicité et elle est rapidement dégradée dans un liquide simulant la digestion (Richards *et al.* 2003).

Les facteurs de transcription sur- ou sous-exprimés proviennent du maïs et sont donc couramment consommés par l'Homme ou l'animal. A ce jour, aucune donnée relative à ces protéines de maïs ne laisse supposer qu'une quelconque toxicité pourrait leur être associée. (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*, GFP et des facteurs de transcription, la non-toxicité des différentes protéines synthétisées, 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.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **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.
- **Berg DE. and Berg CM (1983)** The prokaryotic transposable element Tn5. Biotechnology, **1** : 417-435.
- **Bevan MW., Flavell RB. and Chilton MD. (1992)** A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. 1983. Biotechnology, **24** : 367-370.
- **Blazquez M. A., (2000)** Flower development pathways. Journal of Cell Science, **113**: 3547-3548.
- **Blazquez, M. A., J. H. Ahn and D. Weigel, (2003)** A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. Nature Genetics, **33** : 168-171.
- **Chardon et al. (2005).** Phylogenomic analysis of the PEBP gene family in cereals. J. Mol. Evol. **61** : 579-590.
- **Colasanti, J., Z. Yuan and V. Sundaresan, (1998)** The indeterminate gene encodes a zinc finger protein and regulates a leaf-generated signal required for the transition to flowering in maize. Cell, **93** : 593-603.
- **Danilevskaya O., Hermon P., Shirroun D., Bruggemann E., Muszynski M;G. and Ananiev E. (2003).** Functional analysis of the maize FT/TFL homologs reveals potential players in the floral transition. 45th annual Maize Meeting Conference, Lake Geneva, Poster Abstract 79.
- **Davies J. and Smith DI. (1978)** Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. Ann. Rev. Microbiol., **32** : 469-518.
- **Depicker A., Stachel S., Dhaese P., Zambrisky P. and Goodman H.M. (1982)** Nopaline synthase : Transcript mapping and DNA sequence. Journal of Molecular and Applied Genetics, **1** : 561-573.
- **Heinemann J. et Traavik T. (2004)** Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants. Nature Biotech, **22** : 1105-1119.
- **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.

- **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.
- **Izawa, T., Y. Takahashi and M. Yano, (2003)** Comparative biology comes into bloom: genomic and genetic comparison of flowering pathways in rice and *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**: 113-120.
- **Jenkins *et al.*, (1999)**. Dehiscence-related expression of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding a polygalacturonase in transgenic plants of *Brassica napus* [in this reference the AtSac66 gene is named ESJ2A]. *Plant Cell and Environment* **22** : 159-167.
- **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.
- **Kojima, S., Y. Takahashi, Y. Kobayashi, L. Monna, et T. Sasaki (2002)** Hd3a, a rice ortholog of the *Arabidopsis* FT gene, promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions. *Plant and Cell Physiology* **43**: 1096-1105.
- **Lohmann J. U., Hong R. L., Hobe M., Busch M. A., Parcy F., Simon R. and Weigel D. (2001)**. A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell*, **105**, 793-803.
- **Long D., Goodrich J., Wilson K., Sundberg E., Martin M., Puangsomlee P. and Coupland G. (1997)** Ds element on all five *Arabidopsis* chromosomes and assessment of their utility for transposon tagging. *Plant Journal*, **11** : 148.
- **Lorentz M.G. and Wackernagel W. (1994)** Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiology Rev.*, **58** : 563-602.
- **McElroy, D. Zhang, W. Cao, J. Wu, R (1990)**. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell*, **2** : 163
- **Mc Elroy D., Blowers A.D., Jenes B., Wu R. (1991)** Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act 1) 5' region for use in monocot transformation. *Molecular and General Genetics*, **231** : 150-160.
- **Messing J. (1983)** New M13 vectors for cloning. *Methods in enzymology*, **101** : 20-78.
- **Morgante, M., and F. Salamini, (2003)** From plant genomics to breeding practice. *Current Opinion in Biotechnology*, **14**: 214-219.
- **Nemoto Y, Kisaka M, Fuse T, Yano M, Ogihara Y (2003)**. Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the CONSTANS flowering time gene in transgenic rice. *Plant J.*, **36** : 82-93
- **Nielsen K., Olsen O. and Oliver R. (1999)** A transient expression system to assay putative antifungal genes on powdery mildew infected barley leaves *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **54** : 1-12

- **Oakuley J., Lightner O. Feldman K., Yadaw M., Lark H. and Browse J. (1994)** *Arabidopsis* FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell*, **6** : 147-158
- **Richards H.A., Han C.T., Hpkins R.G., Failla M.L., Ward W.W. Stewart C.N. (2003)** safety assessment of recombinant Green fluorescent protein orally administered to weaned rats. *J. Nutr.*, **133** : 1909-1912.
- **Salvi, S., R. Tuberosa, E. Chiapparino, M. Maccaferri, S. Veillet *et al.*, (2002)** Toward positional cloning of Vgt1, a QTL controlling the transition from the vegetative to the reproductive phase in maize. *Plant Molecular Biology*, **48** : 601-613.
- **Simpson GG, Dijkwel PP, Quesada V, Henderson I, Dean C. (2003).** FY is an RNA 3' end-processing factor that interacts with FCA to control the *Arabidopsis* floral transition. *Cell*, **113**, 777-87.
- **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 3rd international symposium on the biosafety results of field 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.
- **Steward C.N. (2001)** The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Rep.* **20** : 376-382
- **Tabor, H. K., N. J. Risch and R. M. Myers, (2002)** Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nature Reviews Genetics*, **3** : 391-396.
- **Takahashi, Y., A. Shomura, T. Sasaki and M. Yano (2001)** Hd6, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the alpha subunit of protein kinase CK2. *PNAS* **98** : 7922-7927.
- **Thornsberry, J. M., M. M. Goodman, J. Doebley, S. Kresovich, D. Nielsen (2001)** Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nat Genet.*, **28** : 286-289.
- **Verdaguer B., de Kochko A., Beachy R.N. and Fauquet C. (1996)** Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants of the cassava vein mosaic virus (CsVMV) promoter. *Plant Mol. Biol.*, **31**: 1129-1139.
- **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.
- **Welch, S. M., J. L. Roe and Z. S. Dong, (2003)** A genetic neural network model of flowering time control in *Arabidopsis thaliana*. *Agronomy Journal*, **95** : 71-81.

- **White J., Chang S.Y.P. and Bibb M.J. (1990)** A cassette containing the *bar* gene of *Streptomyces hygrosopicus* : a selectable marker for plant transformation. Nucl. Ac. Res., **18** : 1062.
- **Yano, M., Y. Katayose, M. Ashikari, U. Yamanouchi, et L. Monna, (2000)** Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the arabidopsis flowering time gene CONSTANS. Plant Cell, **12**: 2473-2483.
- **Yamamoto S., Kobayashi Y., Abe M. and Araki T. (2002).** Flowering-time gene FD encodes a bZIP protein which is required for the function of a floral pathway integrator FT. In 13th International Conference on Arabidopsis Research, (ed. Seville (Spain)).
- **Zambryski P., Tempe J. (1989)** Transfer and function of ADN-T genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plant. Cell, **56** : 193-201.