

Date de soumission : Novembre 2002

**VALIDATION D'UN CONCEPT DE
RESISTANCE
A LONG TERME AU VIRUS DE LA
RHIZOMANIE (BNYVV) :**

**EXPERIMENTATION
EN PLEIN CHAMP DE BETTERAVES
SUCRIERES
MODIFIEES GENETIQUEMENT POUR
RESISTER AU BNYVV**

(PROGRAMME EXPERIMENTAL : 2003 - 2006)

*Advanta France
B.P. 58
Zone Industrielle - Route de Lavardac
47600 NERAC
France*

*Tél : 00 33 553 97 60 00
Fax : 00 33 553 65 27 60*

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	5
A. INFORMATIONS GENERALES.....	6
1. Nom et adresse du notifiant	
2. Qualification et expérience des scientifiques responsables	
3. Titre du projet	
4. Expérience et développements ultérieurs envisagés	
B. INFORMATIONS CONCERNANT LES PLANTES RECEPTRICES	8
1. Nom scientifique et taxonomie	
2. Informations concernant la reproduction	
3. Capacité de survie	
4. Dissémination	
5. Distribution géographique de la plante	
6. Description de l'habitat naturel de la plante, y compris les informations sur les prédateurs naturels, les parasites, les concurrents et les symbiontes	
7. Interactions potentiellement significatives de la plante avec des organismes autres que des plantes dans son écosystème habituel	
C. INFORMATIONS CONCERNANT LA MODIFICATION GENETIQUE.....	18
1. Description des méthodes utilisées pour la modification génétique - Origine du matériel expérimental	
2. Nature et source des vecteurs utilisés	
3. Taille, origine et fonction voulue de chaque fragment du vecteur	

D. INFORMATIONS CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE 20

1. Description des traits et caractéristiques qui ont été introduits ou modifiés
2. Information sur les séquences réellement transférées ou délétées
3. Information concernant l'expression de l'insert
4. Description des différences entre la plante génétiquement modifiée et la plante réceptrice
5. Stabilité génétique des betteraves modifiées
6. Possibilité de transfert du matériel génétique des plantes génétiquement modifiées dans d'autres organismes
7. Toxicité potentielle liée à la modification
8. Mécanismes d'interactions entre la plante génétiquement modifiée et les organismes cibles
9. Interactions potentiellement négatives avec les organismes non ciblés
10. Description des méthodes de détection et d'identification des plantes génétiquement modifiées
11. Informations sur les disséminations précédentes de la plante génétiquement modifiée

E. INFORMATIONS CONCERNANT LE SITE DE DISSEMINATION..... 27

1. Localisation et étendue des sites de dissémination
2. Description de l'écosystème du site de dissémination
3. Présence d'espèces apparentées sauvages ou cultivées sexuellement compatibles

F. INFORMATIONS CONCERNANT LA DISSEMINATION 28

1. Objectif de la dissémination
2. Date et durée prévues de l'expérimentation
3. Méthode de dissémination envisagée
4. Préparation du site et culture
5. Nombre approximatif de plantes

G. INFORMATIONS SUR LES PLANS DE SURVEILLANCE, DE CONTRÔLE ET DE TRAITEMENT DU SITE ET DES DÉCHÊTS APRES DISSEMINATION..... 30

1. Précautions prises
2. Description des méthodes de traitement du site après dissémination
3. Description des méthodes de traitement du matériel et déchets issus des plantes génétiquement modifiées après dissémination
4. Description des plans et des techniques de surveillance
5. Description des plans d'urgence

H. INFORMATIONS SUR LES EVENTUELLES INCIDENCES DE LA DISSEMINATION DES PLANTES GENETIQUEMENT MODIFIEES SUR L'ENVIRONNEMENT 33

1. Probabilité des plantes génétiquement modifiées à devenir plus persistantes que les plantes parentales ou réceptrices ou à se propager plus rapidement dans les habitats naturels
2. Avantages ou inconvénients sélectifs conférés aux autres espèces végétales sexuellement compatibles, qui peuvent résulter du transfert de matériel génétique de la plante génétiquement modifiée
3. Incidence écologique éventuelle des interactions entre la plante génétiquement modifiée et les organismes ciblés
4. Incidence écologique éventuelle d'interactions possibles avec les organismes non ciblés



LISTE DES ABREVIATIONS

amp	: gène β - lactamase de E. coli
bp	: base pair = paire de bases
BNYVV	: virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave (beet necrotic yellow vein virus)
CaMV35S	: promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur
CP	: protéine de la capside (coat protein)
IGPD	: enzyme imidazole glycerole phosphate dehydratase
Pat	: phosphinotricine acetyl transferase
PEG	: polyéthylène glycol
PPT	: phosphinitricine
P15	: gène du BNYVV codant pour la protéine P15, impliquée dans le mouvement du virus de cellules à cellules
P15-4	: séquence dérivée du gène P15 du BNYVV, porteur d'une modification de sa séquence nucléique (mutation 4) (Lauber <i>et al.</i> , 2001).
TGB	: triple gene block
Ubi	: promoteur codant pour le gène ubiquitine d' <i>Arabidopsis thaliana</i>



A. INFORMATIONS GENERALES

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

Ce document est présenté par ADVANTA FRANCE SA, Zone Industrielle, route de Lavardac, 47600 Nérac. ADVANTA FRANCE est une filiale du groupe ADVANTA.

2. Qualification et expérience des scientifiques responsables

La mise en place et la conduite culturale des essais seront supervisées par le personnel expérimenté de SES France, (Ferme de l'hermitage, rue de Bihucourt, 62121 Gomiécourt, France).

La coordination scientifique est assurée par l'équipe de chercheurs de de la société ADVANTA (Advanta biotechnology, SES-Europe, Industriepark 15, Tienen 3300, Belgique).

3. Titre du projet

Validation d'un concept de résistance à long terme au virus de la rhizomanie (le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave, BNYVV): expérimentation en plein champ de betteraves sucrière modifiées génétiquement pour résister à la rhizomanie.

La demande porte sur un programme expérimental de quatre ans (2003-2006) visant à l'évaluation en plein champ d'hybrides génétiquement modifiés de betterave sucrière, exprimant des gènes conférant des propriétés de résistance au virus de la rhizomanie et un gène de tolérance à l'herbicide glufosinate (gène *pat*) utilisé comme marqueur de sélection.

4. Développements ultérieurs envisagés

4.1 Expérience antérieure

Le dossier présenté ici concerne la prolongation du programme expérimental initié en France 2001 (dossier B/FR/01/02/02), visant à l'évaluation en plein champ de betterave sucrière génétiquement modifiée, exprimant un gène conférant des propriétés de résistance au virus de la rhizomanie et un gène de tolérance à l'herbicide glufosinate (gène *pat*) utilisé comme marqueur de sélection.

Les deux évènements de transformation décrits dans le présent dossier ont aussi été testés en Belgique en 2002 (B/BE/02/V3) dans un programme expérimental similaire.

4.2 Objectifs de l'essai et développements

Le programme expérimental initié en 2001 a pour objectif la validation, en conditions agronomiques réelles, d'un nouveau concept de résistance, à long terme, au virus de la rhizomanie (le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave, BNYVV).

Il fait partie d'un projet de recherche visant à diversifier les sources de résistance à la rhizomanie de la betterave sucrière, une maladie virale qui représente un problème sanitaire majeur dans cette culture. L'objectif d'une résistance transgénique est d'assurer l'immunité de la betterave dans toutes les conditions d'infection virale.

Les observations et les analyses pratiquées lors des expérimentations en plein champ menées en 2001 et 2002 ont indiqué que les betteraves génétiquement modifiées testées alors, expriment des propriétés de résistance à ce virus. Plus particulièrement les lignées et les hybrides dérivés des deux évènements de transformation décrits dans le présent dossier sont résistants.

Le dispositif expérimental proposé pour la période 2003-2006 est essentiel pour confirmer que:

- (1) le mécanisme escompté peut assurer un blocage rapide de la multiplication et de la diffusion du virus dans les racines de betterave en conditions d'infection naturelles;
- (2) l'expression de la séquence testée conduit à rendre les plantes résistantes à différentes souches de virus BNYVV;
- (3) l'expression constitutive de la séquence testée conduit à rendre les plantes immunes tout au long de la saison;
- (4) l'expression de la séquence testée permet de restaurer le rendement de la plante.

Les évènements de transformation indépendants ont été sélectionnés, sur base d'expériences menées en conditions confinées, pour leur haut niveau de résistance à la rhizomanie.

Ces transformants font partie d'un programme de recherche et développement dont le but est de valider un concept de résistance au BNYVV basé sur l'interaction entre l'expression de gènes introduits dans le génome végétal et les processus de mouvement du virus dans la plante infectée.

Ces deux évènements de transformation ont été produits à titre expérimental. Ils ne sont pas destinés à un développement ultérieur.

B. INFORMATIONS CONCERNANT LES PLANTES RECEPTRICES

1. Nom scientifique et taxonomie

Beta vulgaris sous-espèce *vulgaris*, appartenant à la famille des *Chenopodiaceae*.
(Nom commun usuel : betterave sucrière).

2. Informations concernant la reproduction

a) Caractéristiques phénotypiques

La betterave sucrière est une plante amplement décrite et étudiée. Elle possède des caractères phénotypiques distinctifs qui permettent une identification sans équivoque. Les génotypes peuvent, par ailleurs, être identifiés spécifiquement à l'aide de marqueurs moléculaires de type RFLP , AFLP, microsatellites (SSR) ou autres qui révèlent un abondant polymorphisme au niveau de l'ADN .

i. Reproduction

Généralités

La betterave sucrière se reproduit par fécondation libre conduisant à la formation de semences. La betterave est naturellement autostérile, une plante ne produisant que peu ou pas de semence en isolation stricte.

Les fleurs sont petites et sessiles, généralement groupées par 2 à 8. Elles consistent en un pistil entouré de cinq étamines et un périanthe de cinq sépales. Les pétales sont absents. Les fleurs sont hermaphrodites et se caractérisent par la protandrie.

La sélection exploite de nombreux caractères particuliers afin de produire des variétés hybrides à haute valeur agronomique. En particulier, la stérilité mâle nucléo-cytoplasmique et nucléaire, la monogermie, la polyploidie sont des caractéristiques amplement exploitées dans la création variétale. Les semences commerciales sont nécessairement le résultat d'une hybridation entre un pollinisateur et une plante mâle-stérile, usuellement dénommée le porte-graines.

Pollinisation

La betterave sucrière est normalement allogame, et anémophile, c'est à dire pollinisée par le vent. Une proportion réduite de la pollinisation est due aux insectes particulièrement dans des zones où la multiplication de graines implique des surfaces importantes de concentrations de plantes. Des insectes tels les *Cantharidae*, les *Coccinelidae*, les *Syrphidae*, les *Muscidae*, ou les abeilles, portant des quantités significatives de pollen de betteraves, ont été identifiés dans des champs de multiplication.

La viabilité du pollen est de maximum 24 à 36 heures en conditions optimales. L'émission de pollen augmente au cours de la matinée pour atteindre un pic entre 14 heures et 16 heures. L'humidité relative croissante réduit l'émission et la capacité germinative du pollen.

Floraison

La betterave sucrière cultivée est une plante bisannuelle nécessitant une période de vernalisation (basse température et jours courts) pour induire sa floraison. L'allongement des jours, au printemps, entraîne le phénomène d'allongement de la hampe florale (tige portant les fleurs) et finalement, après fécondation, la production de graines.

Le besoin en froid et la longueur de la photopériode induisant l'initiation de la hampe florale sont fonctions du génotype. Le besoin en froid, la sensibilité aux jours longs, les maxima de sensibilité à la dévernalisation constituent autant de caractéristiques génotypiques.

Le comportement bisannuel est un caractère quantitatif dont une des formes extrêmes est l'annualité, une caractéristique qui se rencontre dans de nombreuses populations de betteraves sauvages (*Beta vulgaris ssp maritima*) dans le Sud de l'Europe.

Annualité

La betterave sauvage (*Beta vulgaris ssp maritima*) montre une grande variabilité de comportement pour le caractère d'annualité. Divers types sauvages méditerranéens ou du Sud-Ouest de la France n'ont pas besoin de période de vernalisation (basse température) pour fleurir et monter à graines (type annuel).

Le caractère d'annualité se retrouve dans les populations de betterave adventices des zones de culture betteravière.

Semences

Après fécondation, l'ovaire est englobé dans le périanthe qui devient ligneux. Les semences peuvent être multigermes - formées par aggrégation des ovaires fécondés d'un groupe de fleurs -, ou monogermes - issues d'une fleur isolée-. Le caractère de monogermie est gouverné par un seul gène récessif.

Les semences de betterave ont un potentiel de survie de plusieurs années selon les conditions climatiques et édaphique.

Diverses études ont montré que le pouvoir germinatif chute à 25 % pour les graines enfouies à 2 cm de profondeur et à 3 % pour celles séjournant à 10 cm. Des semences ayant séjourné à des profondeurs de 20 cm peuvent encore germer en cas de retour à la surface - de l'ordre de 40 % après 40 mois de séjour et 20 % après 4 ans de séjour - indiquant une viabilité accrue suite à une dormance.

Autres voies de dissémination

Dans les régions de culture de racines, des racines issues de la culture précédentes peuvent survivre (betteraves traînantes). La racine peut, au niveau du collet ou à partir de fragments de collet, produire spontanément des bourgeons donnant naissance à des boutures. Ce type de betteraves survivantes se trouve sur les champs ou aux abords immédiats des champs de culture. Dans les conditions de culture traditionnelles, la fréquence de plantes de ce type survivant au cours de la rotation et montant à graines est nulle ou négligeable. En effet, les herbicides sélectifs de la culture suivante contrôlent automatiquement toute betterave survivante.

La dispersion de graines lors des transports et mouvements de semences dans les régions de production de semences. Ce facteur est significatif à l'échelle locale dans les zones de production. Il fait l'objet d'un soin de plus en plus attentif de la part des producteurs afin de réduire le nombre de foyers de plantes susceptibles d'entretenir des populations endémiques de betteraves adventices ou rudérales.

ii. Facteurs spécifiques affectant la reproduction

Voir paragraphe précédent i. 'Reproduction'

iii. Temps de génération

Voir paragraphe i. 'Reproduction'



b) Compatibilité sexuelle avec d'autres espèces végétales ou cultivées

Le transfert d'information génétique entre membres de la section *vulgaris* est possible, particulièrement vis-à-vis de *Beta maritima* (betterave maritime) et *Beta macrocarpa*. Néanmoins, aucune de ces espèces n'est présente dans la région où se situeront les essais (voir point 5, Distribution géographique de la plante et chapitre E).

Les betteraves cultivées sont vraisemblablement dérivées de la sous-espèce *maritima*. Betterave sucrière, betterave fourragère, betterave rouge, et blette sont toutes apparentées et inter-fertiles.

3. Capacité de survie

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

Voir paragraphe 2. a) i. 'Reproduction'

b) Le cas échéant, facteurs spécifiques affectant la capacité de survie

Voir paragraphe 2. a) i. 'Reproduction'

4. Dissémination

a) Forme et étendue de la dissémination

Voir paragraphe B. 2. a) i. et paragraphe B. 2. b).

b) Le cas échéant, facteurs spécifiques affectant la capacité de survie

Voir paragraphe B. 2. a) i. et paragraphe B. 2. b).

5. Distribution géographique de la plante

La section *Beta* a pour centre d'origine la région méditerranéenne, à partir duquel le genre s'est disséminé à travers la plupart des écosystèmes littoraux européens, aussi bien vers le Nord que vers l'Ouest (Iles Canaries). Vers l'Est, la zone de distribution s'étend jusqu'à l'Est de l'Inde.

Toutes les sous-espèces de la betterave (*Beta vulgaris*) sont parfaitement compatibles entre-elles.

La betterave sucrière *Beta vulgaris ssp. vulgaris* est vraisemblablement dérivée de la sous-espèce *maritima*. C'est une culture importante de la plupart des régions européennes (Ouest et Est).

La betterave maritime, *Beta vulgaris ssp. maritima*, est peu fréquente sur les côtes belges, néerlandaises et allemandes mais assez commune le long du littoral anglais et Ouest français. Les plantes se trouvent généralement dans une bande assez étroite le long de la côte, à quelques dizaines de mètres au-dessus de la ligne de marée. En compétition avec d'autres espèces comme par exemple des graminées, les betteraves sauvages Nord atlantiques sont incapables de s'établir et de s'imposer durablement.

Dans les régions méditerranéennes, la betterave sauvage se retrouve non seulement dans les zones littorales mais également à l'intérieur des terres.

Les autres membres de la section Beta, *Beta patula* et *Beta macrocarpa*, se trouvent exclusivement dans la région méditerranéenne. Ces espèces ont des caractères végétatifs et génératifs distinctifs.

La betterave rudérale est présente dans tout le Sud-ouest de la France, de Bordeaux à Narbonne.

L'hybridation entre betteraves sauvages ou rudérales et betteraves sucrières dans les zones de production de semences de betterave en France est donc inhérente à la biologie florale de la betterave et à la distribution géographique de formes sauvages ou rudérales. Cependant, dans les régions de production de semences, un ensemble de mesures et de pratiques recommandées auprès des agriculteurs multiplicateurs permettent de minimiser la quantité de plantes capables de contaminer les multiplications.

Dans la rotation pratiquée dans les régions de culture, les betteraves adventices sont contrôlées par une large gamme d'herbicides sélectifs de sorte que la betterave n'est pas répertoriée comme mauvaise herbe de quelque culture que ce soit, en dehors de la betterave sucrière.

6. Description de l'habitat naturel de la plante, y compris les informations sur les prédateurs naturels, les parasites, les concurrents et les symbiontes.

Dans les zones de culture de betterave sucrière, les betteraves adventices ne font pas concurrence aux autres cultures de la rotations. En outre, les pratiques culturales, en particulier les herbicides des autres cultures en rotation avec la betterave, permettent d'éliminer les betteraves adventices.

La betterave est sujette à de nombreuses interactions: action de prédateurs naturels parmi lesquels des insectes, des oiseaux et des petits mammifères. D'autre part, plusieurs agents pathogènes de la betterave sont recensés, parmi lesquels le virus des nervures jaunes de la betterave (BNYVV, Beet Necrotic Yellow Vein Virus), qui provoque une maladie largement répandue dans le monde, la rhizomanie de la betterave.

a) **Importance de la rhizomanie**

Cette maladie virale est provoquée par un benyvirus, le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave (BNYVV: beet necrotic yellow vein virus), qui est transmis à la racine de la betterave par le champignon du sol *Polymyxa betae*.

La rhizomanie de la betterave sucrière est actuellement le problème sanitaire majeur de la culture betteravière dans le monde. Observée d'abord en Italie, elle s'est rapidement répandue dans de nombreux pays d'Europe dont la France, l'Allemagne, les pays de l'Europe de l'Est, et plus récemment en Angleterre et aux Pays-Bas. Parallèlement à sa progression en Europe elle a été observée dans la plupart des régions du monde, par exemple au Japon aux Etats-Unis et en Chine.

En France la progression de la rhizomanie a été particulièrement sensible et ne cesse de s'amplifier. Si l'on considère le volume des ventes des semences de betterave sucrière rhizo-tolérantes ces dernières années: en 1999, 23% des semences de betteraves utilisées étaient rhizo-tolérantes; elles ont représenté 32% des ventes de semences de betterave sucrière en 2000 ; en 2001, 48% des semences de betteraves utilisées étaient rhizo-tolérantes et leur part de marché a atteint 62% des ventes de semences de betterave sucrière en 2002.

Dans les parcelles contaminées, le rendement de 60-70 tonnes de racines à l'hectare en zone saine, peut chuter jusqu'à 20 tonnes. Parallèlement, le taux de sucre normalement voisin de 16-17% baisse jusqu'à 8% en moyenne. De plus, l'augmentation de la concentration en ions Na⁺ et K⁺ dans les racines se traduit par une diminution de la pureté de jus et entraînent une baisse importante du rendement d'extraction du sucre et de rentabilité pour l'industrie sucrière.

b) **Utilisation de sources de résistance issues du genre Beta**

La gravité de cette maladie est due en grande partie à son caractère endémique entraînant son extension par le sol dans la plupart des pays producteurs de betterave. Comme il n'existe pas de méthode efficace pour contrôler à grande échelle la propagation d'un tel virus par des moyens chimiques ou physiques, les efforts se sont concentrés sur la recherche de sources de résistance génétique issues de l'espèce *Beta vulgaris*. Différents gènes de tolérance au virus ont été identifiés, dont certains sont utilisés avec succès par les sélectionneurs de betterave sucrière.

Depuis 1986, des variétés tolérantes à la rhizomanie ont été diffusées sur le marché

français, sauvant la culture betteravière dans des zones infectées qui étaient prêtes à l'abandonner. Il faut rappeler que la betterave sucrière est une composante essentielle de la rotation et contribue significativement au revenu des agriculteurs.

Des études détaillées ont montré que le degré de sensibilité d'une plante à l'infection du BNYVV reflète généralement le niveau de diffusion ou de translocation du virus dans les tissus. Cependant, peu d'études semblent indiquer que, bien qu'issus de différentes sources de betteraves sucrières ou de betteraves sauvages, les gènes de tolérance utilisés actuellement interviennent dans des mécanismes de résistance distincts.

c) **Biologie du virus**

Le BNYVV est un virus constitué de quatre types de particules ribonucléoprotéiques renfermant chacun un ARN simple brin codant pour des fonctions particulières du virus. Les ARN 1 et 2 sont requis pour la réplication de l'ARN viral, l'assemblage, le mouvement et la transmission du virus. L'ARN 3 est nécessaire au développement de la maladie dans la betterave et l'ARN 4 à son cycle dans le champignon vecteur *Polymyxa betae*.

Les différentes souches de virus BNYVV peuvent être classées, par analyse moléculaire, en deux groupes majeurs, les types A et B. Le BNYVV de type A est trouvé dans la plupart des pays européens, aux Etats Unis, en Chine et au Japon. Le BNYVV de type B est essentiellement détecté en Allemagne et en France. Ces deux pathotypes ont des séquences nucléotidiques homologues à 97%.

Certaines souches de virus BNYVV trouvées au Japon et en France contiennent un cinquième ARN, l'ARN 5, qui code pour une protéine similaire à celle de l'ARN 3 et impliquée dans la symptomatologie de la maladie dans la betterave. Des tests d'inoculation avec du virus BNYVV contenant ce cinquième ARN causent, dans la betterave, des symptômes de maladie beaucoup plus sévères que les souches ne contenant pas cet ARN supplémentaire.

En France, cette souche particulière contenant l'ARN 5 est exclusivement trouvée dans la région de Pithiviers et est appelée pathotype P.

La présence de cette souche P a récemment été mise en évidence au Royaume Uni.

La progression très rapide de la maladie dans les zones de culture betteravière et la découverte récente de souches de BNYVV beaucoup plus agressives démontrent qu'il y a un intérêt certain à diversifier les sources et les mécanismes de résistance, de façon à établir, en les utilisant séparément ou en combinaison, une stratégie de résistance à long terme au BNYVV.

L'objectif majeur d'une résistance transgénique est d'assurer l'immunité de la betterave dans toutes les conditions d'infection virale.

d) Apport des techniques de la modification génétique dans les stratégies de résistance virale

La carte génétique complète de plus de cent virus de plantes est actuellement connue. Dans les principaux groupes de virus, certains gènes ont été localisés sur le génome viral et leur mécanisme d'expression ainsi que leur rôle dans le cycle de multiplication du virus a été établi. Ces découvertes récentes ont largement contribué à développer des stratégies de lutte contre les virus, par insertion de séquences virales spécifiques dans le génome des plantes ciblées par leurs attaques.

Depuis 1986, de nombreuses publications ont décrit l'utilisation de séquences de gènes viraux pour conférer aux plantes un haut niveau de résistance à des virus.

e) Développement des techniques de modification génétique dans les stratégies de résistance virale appliquées à la betterave

Dans le cas de la betterave, l'expression de la séquence de la protéine de la capsid du BNYVV a été reportée par de nombreux auteurs. Les rapports ne donnent cependant que peu de données quant aux niveaux de résistance observés lorsque les betteraves sont cultivées en terres rhizomaniées. En outre, les informations publiées ne permettent pas de conclure que le mécanisme de résistance induit par ce type de séquence permette d'obtenir, une résistance totale des betteraves au BNYVV.

Le présent document décrit une nouvelle stratégie de résistance à la rhizomanie, par insertion dans la betterave de séquences issues du BNYVV, et modifiées de façon à ne plus être fonctionnelles pour le virus, tout en conférant un haut niveau de résistance à l'infection virale.

f) Stratégie génétique développée dans le projet

Le BNYVV est un virus comprenant quatre (ou cinq) ARNs. Les ARN 1 et 2 sont requis pour la réplication de l'ARN viral, l'assemblage, le mouvement et la transmission du virus par son vecteur. Les ARN 3, 4 (et 5) sont également nécessaires au développement de la maladie et à son cycle dans le vecteur *Polymyxa betae*.

Dans le cas du virus de la rhizomanie, le mouvement du virus de cellule à cellule est gouverné par trois gènes. Ils forment un complexe connu sous le nom de 'triple gene block' (TGB) et codent pour trois protéines virales identifiées respectivement d'après leur masse moléculaire P42, P13 et P15. Celles-ci sont impliquées dans la formation d'un complexe spécifique indispensable au mouvement viral de cellule à cellule.

La stratégie explorée dans ce projet consiste à rendre la plante résistante au BNYVV, en empêchant le mouvement du virus de cellule à cellule. Pour ce faire, un gène du ‘triple gene block’ essentiel au mécanisme de mouvement du virus, le gène P15, a été isolé et transféré dans la plante, de sorte que son expression dans la plante perturbe et prévienne le mouvement du virus de cellule à cellule .

Afin d’être inopérant auprès du virus, le gène a été modifié pour que le produit pour lequel il code soit différent de la protéine originale issue du virus et soit donc non-fonctionnel.

Dans le cas du BNYVV, la validité de ce concept a été initialement démontrée en utilisant un ‘vecteur d’expression’ (replicon) et *Chenopodium quinoa*, une espèce ‘modèle’ de la famille des *chenopodiaceae*, qui est sensible au BNYVV et exprime les symptômes de la maladie au niveau des feuilles.

Par la suite, les séquences modifiées sélectionnées pour leur potentiel à inhiber le mouvement du BNYVV de type sauvage, ont été insérées dans le génome de betterave par transformation.

Les transformants primaires obtenus ont été mis en culture en conditions contrôlées dans du sol rhizomanié et le niveau d’infection viral a été mesuré dans les racines au terme de l’expérience. Dans ce dispositif de bio-essais, certains transformants primaires se sont révélés être très résistants à l’infection par le BNYVV.

L’ensemble du concept a été décrit dans les brevets WO 98/07875 et WO 00/03025.

g) Objectifs du programme expérimental

Les observations et les analyses pratiquées lors des expérimentations en plein champ menées en 2001 et 2002 ont indiqué que des betteraves génétiquement modifiées par introduction d’une séquence codant pour une protéine virale modifiée rendue non fonctionnelle, expriment des propriétés de résistance au BNYVV. Plus particulièrement les lignées et les hybrides dérivés des deux évènements de transformations décrits dans le présent dossier sont résistants.

Le programme expérimental d'essais de champ proposé pour la période 2003-2006 est essentiel pour confirmer que:

1. le mécanisme escompté peut assurer un blocage rapide de la multiplication et de la diffusion du virus dans les racines de betterave en conditions d'infection naturelles;
2. l'expression de la séquence testée conduit à rendre les plantes résistantes à différentes souches de virus BNYVV;
3. l'expression constitutive de la séquence testée conduit à rendre les plantes immunes tout au long de la saison dans des conditions agronomiques variées;
4. l'expression de la séquence testée permet de restaurer le rendement de la plante.

Les événements de transformation ont été sélectionnés sur base de critères variés, parmi lesquels le niveau de résistance à la rhizomanie.

Ces deux transformants ont été produits à titre expérimental ne sont pas destinés à un développement ultérieur.

7. Interactions potentiellement significatives de la plante avec des organismes autres que des plantes dans son écosystème habituel. (Toxicité/effets allergiques)

Il n'y a aucun effet toxique ou allergique, connu qui soit associé à la betterave sucrière.

La modification génétique considérée dans le cadre de ce dossier est à vocation strictement scientifique et expérimentale.

Les betteraves produites dans le cadre des essais proposés ne sont destinées ni à l'alimentation humaine ni à l'alimentation animale. Les essais seront récoltés avant l'ouverture de la campagne betteravière. A la récolte, les betteraves seront détruites selon les modes opératoires particuliers appliqués à des betteraves modifiées génétiquement issues d'expérimentation en champ.

C. INFORMATIONS CONCERNANT LA MODIFICATION GENETIQUE

1. Description des méthodes utilisées pour la modification génétique - Origine du matériel expérimental

Le protocole de transformation qui a été suivi pour produire les transformants primaires est décrit dans le brevet WO95/10178.

Les bourgeons obtenus ont ensuite été transférés sur un milieu permettant le développement de racines et ont été acclimatés en serre.

2. Nature et source du vecteur utilisé

Deux vecteurs ont été utilisés pour produire les évènements de transformation sélectionnés dans ce dossier.

Les informations détaillées concernant la nature et la source de chaque vecteur ont été fournies aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire chargés de l'évaluation du dossier mais ne sont pas disponibles dans le présent document, compte tenu des obligations liées à la propriété intellectuelle.

3. Taille, origine et fonction voulue de chaque fragment du vecteur

Les plasmides utilisés pour la transformation de la betterave sucrière contiennent le gène codant pour la protéine P15 du virus BNYVV, ayant subi une modification de sa séquence nucléotidique (gène modifié dénommé P15-4) et dont l'expression dans la plante perturbe et prévient le mouvement du virus de cellule à cellule.

Le gène P15 a été modifié de manière à ce que le produit pour lequel il code soit différent de la protéine originale issue du virus et soit donc non-fonctionnel auprès du virus.

Les plasmides utilisés contiennent également le gène synthétique *pat* qui code pour la phosphinithricine acetyl transférase et confère la tolérance à l'herbicide glufosinate-ammonium en catalysant une réaction qui l'inactive. Dans ce projet, le gène *pat* a été utilisé comme marqueur de sélection durant la phase de transformation et de culture cellulaire.

Les autres séquences des vecteurs étant d'origine procaryote ou dérivées de la levure boulangère, aucune d'elles ne peut être exprimée dans la plante.

Les informations complémentaires concernant la taille, l'origine et la fonction voulue de chaque fragment du vecteur ont été fournies aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire chargés de l'évaluation du dossier mais ne sont pas disponibles ici compte tenu des obligations liées à la propriété intellectuelle.



D. INFORMATIONS CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE.

Certaines informations relatives à la modification génétique ont été fournies sous forme confidentielle aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire chargés de l'évaluation de ce dossier. Elles ne figurent pas dans ce document afin d'en préserver la propriété intellectuelle.

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

Les plasmides utilisés pour la transformation de la betterave sucrière contiennent deux gènes destinés à être exprimés dans la plante après transformation, le gène P15-4 et le gène *pat*.

- La séquence P15-4 est dérivée du gène qui code pour la protéine P15 du virus BNYVV. Cette séquence insérée et exprimée dans la betterave confère une forte résistance au virus BNYVV.

Compte tenu du mécanisme de mouvement mis en oeuvre par les protéines issues des séquences TGB, on peut suggérer que l'expression par la plante de la séquence modifiée P15-4 donne lieu à un produit qui entre en compétition avec la protéine virale sauvage pour la formation d'un complexe avec les autres protéines virales du TGB ou avec certains sites ou composants cellulaires interagissant avec le complexe.

L'expression de la séquence P15-4 dans les cellules de la betterave interférerait donc avec les mécanismes de translocation du virus au sein de la plante.

- Le gène synthétique *pat*, qui code pour la phosphinothricine acetyl transférase et confère la tolérance aux herbicides glufosinate-ammonium et Bialaphos en catalysant une réaction qui les inactive.

Le gène *pat* a été utilisé comme marqueur de sélection dans les phases de transformation et de régénération cellulaire.

2. Informations sur les séquences réellement transférées ou délétées

Les séquences réellement transférées dans le génome de la betterave sucrière ont été recherchées par analyse Southern blot et PCR sur les transformants primaires et sur la descendance de plusieurs générations.

Les analyses moléculaires ont démontré que l'intégration est nucléaire. Les gènes sont transmis de manière stable à la descendance, par pollinisation de lignées non génétiquement modifiées.

3. Information concernant l'expression de l'insert

a. La séquence P15-4

La stratégie explorée dans ce projet consiste à immuniser la plante en empêchant le mouvement du virus de cellule à cellule. Pour ce faire, un gène du 'triple gene block' essentiel au mécanisme de mouvement du virus, le gène P15, a été isolé et modifié de sorte que son expression dans la plante perturbe et prévienne le mouvement du virus de cellule à cellule.

Afin d'être inopérant auprès du virus, le gène a subi une modification de sa séquence nucléotidique pour que le produit pour lequel il code soit différent de la protéine originale issue du virus et soit donc non-fonctionnel auprès du virus.

Ces séquences insérées dans la betterave confèreraient une forte résistance au BNYVV en bloquant les mécanismes de translocation du virus au sein de la plante et plus particulièrement de la racine.

La validité de ce concept a été démontrée grâce à l'utilisation d'un système 'vecteur d'expression'(replicon) et *Chenopodium quinoa*, une espèce 'modèle' de la famille des *chenopodiaceae*, qui est sensible au BNYVV et exprime les symptômes de la maladie au niveau des feuilles, sous forme de lésions locales.

Par la suite, les séquences modifiées sélectionnées pour leur potentiel à inhiber le mouvement du BNYVV de type sauvage, ont été insérées dans le génome de la betterave par transformation (voir au point C.1.a.).

Les transformants régénérés après transformation ont été analysés par PCR et Southern blots pour sélectionner les candidats porteurs d'au moins une copie du gène P15 modifié (séquence P15-4), accompagné de ses séquences régulatrices.

Les candidats sélectionnés ont été enracinés et cultivés en chambre climatisée, dans du sol infecté par le virus BNYVV pathotype P. Le pathotype P du BNYVV est décrit comme une des sources de rhizomanie les plus agressives pour la betterave sucrière. Au terme du bio-essai, la quantification du BNYVV dans les racines a été réalisée au moyen d'un test Elisa spécifique.

Il a été démontré qu'il existe une corrélation négative significative entre la concentration moyenne de virus trouvé dans les racines et les performances des génotypes de betteraves cultivés en champ infecté par la rhizomanie.

La lignée non-transgénique, utilisée en transformation pour produire les transformants, a été employée comme témoin non-résistant dans le bio-essai.

Au terme de l'expérience, la quantité de virus mesurée dans les événements de transformation sélectionnés dans ce dossier, s'est révélée significativement inférieure à celle des témoins non transgéniques mis en bio-essai. Ces données semblent indiquer que la séquence P15-4 confère une réduction ou un délai significatif dans l'apparition des symptômes de l'infection, des mécanismes de multiplication ou de diffusion du virus dans la betteraves et en particulier au sein des tissus racinaire.

b. Gène *pat*

Le gène *pat* a été utilisé comme gène marqueur durant la phase de régénération sur milieu sélectif suivant la transformation.

Les transformants primaires ont été régénérés sur un milieu contenant du Bialaphos. La pression de sélection conférée par 0.25 mg de glufosinate par litre de milieu est suffisante pour empêcher la régénération de bourgeons à partir de matériel non modifié génétiquement. Il a été démontré par analyse moléculaire que toutes les plantes régénérées après transformation avec le gène *pat*, contenaient au moins un copie du gène de résistance.

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

a. Mode ou vitesse de reproduction

Le mode de reproduction des plantes transgéniques dérivées des deux événements de transformation décrits dans ce dossier n'est pas modifié par l'expression des transgènes.

Deux générations de semences ont été produites pour chaque événement de transformation. Ces croisements se sont déroulés en conditions confinées (chambres climatisées et serres). Les observations réalisées sur les transformants indiquent que:

- Comme la lignée non transgénique d'origine utilisée en transformation, les deux transformants primaires et les lignées et hybrides qui en dérivent ont besoin d'une période de vernalisation pour passer à l'état reproducteur.

Ces observations de serre ont été confirmées au cours des essais de rendement réalisés en plein champ. Comme prévu, aucune plante transgénique dérivée des événements de transformation n'a développé de hampe florale dans les essais de champ implantés en 2001 et 2002 (B/FR/01/02/02, B/BE/02/V3).

- Pour chaque évènement de transformation, les délais observés entre la fin de la vernalisation et l'apparition de la hampe florale, l'ouverture des fleurs et la récolte de semences matures sont similaires à ceux observés pour des lignées non transgéniques cultivées dans les mêmes conditions.
- Les quantités de semences récoltées sur les plantes transformées par la séquence P15-4 se situent dans les normes observées pour des lignées non transgéniques cultivées dans les mêmes conditions.

b. Dissémination

La capacité de dissémination des plantes génétiquement modifiées dérivées des deux évènements de transformation de ce dossier n'est pas affectée par la modification.

En effet, les observations réalisées en serre et au champ lors de la culture de lignées et d'hybrides dérivés de ces transformants ne révèlent aucun comportement significativement différent de celui des plantes de la lignée non transgénique dont ils sont issus. Les paramètres observés concernent le phénotype (taille des plantes, production de pollen, production de semences) et la précocité de développement durant les phases végétatives et génératives.

c. Capacité de survie

Les critères habituellement utilisés pour caractériser des lots de semences de betterave sucrière ont été appliqués (proportion de graines germées, monogermie et couleur de l'hypocotyle) aux semences de première et de seconde génération dérivées des transformants primaires. Les données obtenues ont été comparées à celles de semences non transgéniques produites dans les mêmes conditions et se sont révélées similaires. Le potentiel de survie à plus long terme (plusieurs années) n'a pas encore pu être testé.

La racine de betterave peut produire spontanément des bourgeons donnant naissance à des boutures. Les expériences en champ menées en Europe de 1994 à 2000 avec des hybrides résistants au glufosinate (gène *pat*) et en 2001 et 2002 (B/FR/01/02/02) avec les transformants décrits dans ce dossier, se sont toujours terminées par l'enfouissement dans le sol des morceaux de racines et des feuilles des plantes en essai. A ce jour, aucune repousse de betteraves transgéniques ou non transgéniques n'a pu être observée à la surface des parcelles d'essais, lors des contrôles réguliers effectués au cours des deux années suivant les expérimentations de betteraves génétiquement modifiées au champ.

Une expérience a été mise en place par Advanta en 1997 en Belgique (B/B/94/WSP2) pour évaluer le potentiel de survie des betteraves génétiquement modifiées résistantes au glufosinate (gène *pat*). Un hybride résistant au glufosinate et son homologue non transgénique ont été semés dans un essai qui n'a pas été récolté en automne. Une évaluation comparée du taux de survie des plantes et de leur aptitude à monter à graines a été réalisée au printemps 1998, pour chacun des hybrides. Au terme de cette expérimentation, aucune différence significative de comportement entre l'hybride génétiquement modifié et son équivalent isogénique non résistant n'a été révélée.

5. Stabilité génétique des betteraves modifiées

L'expression de la résistance à la rhizomanie a été le principal critère de sélection des transformants primaires décrits dans ce dossier. Les transformants primaires ont été sélectionnés parmi d'autres transformants ayant intégré la séquence P15-4, pour leur haut niveau de résistance à la rhizomanie au terme de bio-essais réalisés en conditions confinées.

Les analyses pratiquées sur la descendance des deux transformants ont démontré la stabilité du niveau d'expression du gène P15-4.

D'autre part, les analyses moléculaires réalisées sur les transformants primaires et leur descendance ont démontré que les profils d'insertion restent identiques à ceux observés dans les transformants primaires.

6. Possibilité de transfert du matériel génétique des plantes génétiquement modifiées dans d'autres organismes

Comme dans toute culture traditionnelle de betterave sucrière, les plantes de betterave en essai de champ resteront au stade végétatif durant toute la durée de l'expérimentation.

Des visites hebdomadaires pendant toute la durée de la dissémination permettront de détecter et de détruire immédiatement, bien avant floraison, toute montée à graines qui apparaîtrait dans les parcelles des essais, de sorte qu'il n'y aura aucune possibilité de dissémination des transgènes par du pollen ou par des semences.

Deux années de suivi des parcelles d'essais sont prévues au terme de l'expérimentation. Ces visites ont pour objectif la détection et la destruction de repousses de betteraves qui apparaîtraient à la surface des essais. D'autre part, au cours de ces deux années, les seules cultures autorisées seront celles faisant appel à des herbicides létaux pour la betterave. De sorte qu'il n'y aura pas de possibilité de dissémination de matériel génétique par du pollen ou des semences après l'expérimentation.

7. Toxicité potentielle liée à la modification

La betterave sucrière n'est associée à aucun phénomène toxique ou allergique connu.

La mise au champ d'hybrides dérivés des transformants décrits dans ce dossier est réalisée à titre expérimental pour évaluer l'efficacité de la séquence modifiée P15-4 en conditions agronomiques réelles.

Les betteraves produites dans le cadre des essais proposés ne sont destinées ni à l'alimentation humaine ni à l'alimentation animale.

Les essais seront récoltés avant l'ouverture de la campagne de betterave sucrière. Dès la fin des essais, ces betteraves seront détruites selon les modes opératoires appliqués à des betteraves modifiées génétiquement issues d'expérimentation en champ.

8. Mécanismes d'interactions entre la plante génétiquement modifiée et les organismes cibles

La stratégie explorée dans ce projet consiste à rendre la plante résistante au virus de la rhizomanie en empêchant le mouvement du virus de cellule à cellule. Afin d'être inopérant auprès du virus, le gène a été modifié pour que le produit pour lequel il code soit différent de la protéine originale issue du virus et soit donc non-fonctionnel.

L'hypothèse initiale quant au mode d'action est que la protéine non fonctionnelle entre en compétition avec la protéine P15 du virus 'sauvage' pour la formation d'un complexe avec les autres protéines virales du TGB ou avec certains sites ou composants cellulaires interagissant avec le complexe.

La séquence modifiée P15-4 insérée dans la betterave confère une forte résistance au virus BNYVV en bloquant les mécanismes de translocation du virus au sein de la plante et plus particulièrement de la racine.

9. Interactions potentiellement négatives avec les organismes non ciblés

Il n'y a aucune indication que la modification génétique altère les interactions entre les betteraves génétiquement modifiées et des organismes non-ciblés.

Etant donné la taille des essais prévus dans le programme d'expérimentation, les potentialités de contact avec des organismes non cibles sont extrêmement réduites.

10. Description des méthodes de détection et d'identification des plantes génétiquement modifiées

Les plantes génétiquement modifiées sélectionnées pour cet essai peuvent être identifiées de différentes manières :

- Des analyses moléculaires du génome, de type Southern ou PCR, permettent de démontrer la présence de l'ADN inséré.
- Si elles sont pulvérisées avec du glufosinate, les plantes modifiées survivent alors que les plantes non modifiées meurent.
- Un Test Elisa basé sur un anticorps dirigé contre la protéine *pat* (art. 24016E07, FDW, Steffens Biotechnische analysen GmbH, Germany) permet de révéler la présence de la protéine dans les tissus végétaux.
- Si elles sont cultivées en sol infecté par le BNYVV, les plantes modifiées devraient rester saines, alors que des plantes non modifiées sensibles au virus exhiberont les symptômes typiques de la rhizomanie.
- De plus, un test Elisa spécifique pratiqué sur les racines latérales par exemple, permet de déterminer la quantité de virus présente dans les racines. Ce test permet d'identifier les candidats sensibles et résistants à la rhizomanie. Les plantes génétiquement modifiées dérivées des transformants décrits dans ce dossier, cultivées en sol infecté par le BNYVV révèlent par ce test des quantités significativement moins élevées de virus que des témoins non transgéniques, non résistants à la rhizomanie.

11. Informations sur les disséminations précédentes de la plante génétiquement modifiée

Les événements de transformation faisant l'objet de cette demande d'essai ont été testés au champ en 2001 et 2002 en France (dossier B/FR/01/02/02) et en Belgique (dossier B/BE/02/V3).

Les observations et les analyses pratiquées lors des expérimentations menées en 2001 et 2002 ont indiqué que des betteraves génétiquement modifiées par introduction de la séquence P15-4 expriment des propriétés de résistance au BNYVV. Plus particulièrement les lignées et les hybrides dérivés des deux événements de transformations décrits dans le présent dossier sont résistants.

Depuis 1994, Advanta a également mené de multiples expérimentations agronomiques dans différents pays d'Europe avec des betteraves génétiquement modifiées pour résister à l'herbicide glufosinate.

E. INFORMATIONS CONCERNANT LE SITE DE DISSEMINATION

1. Localisation et étendue des sites de dissémination

Un site de dissémination est prévu en 2003. Le site choisi est situé dans Loiret, une zone bien connue des sélectionneurs de betteraves rhizo-tolérantes et réputées pour l'homogénéité et la constance de la pression de la rhizomanie.

L'essai couvrira une surface maximale de 2500 m².

2. Description de l'écosystème du site de dissémination

Le site d'essai de 2003 sera situé dans un agrosystème dédié aux céréales, blé et orge, la betterave, le colza et le pois protéagineux. Le sol est de type argilo-calcaire dans cette zone.

Comme dans toute culture traditionnelle de betterave sucrière, les plantes en essai resteront à l'état végétatif. Un contrôle régulier sera d'ailleurs mis en place pour éliminer avant floraison toute plante qui développerait un hampe florale.

Il est prévu de mettre en place une bordure sans betterave d'une largeur d'au moins 6 m entre l'essai et les cultures environnantes.

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

Il n'y a pas de betteraves sauvages dans cette région. Cependant, des betteraves adventices, exprimant le caractère annuel se rencontrent fréquemment dans les zones de culture de betterave sucrière. Ces plantes sont sexuellement compatibles avec les plantes de betterave cultivée.

Comme dans toute culture traditionnelle de betterave sucrière, les plantes de betterave des essais de champ resteront au stade végétatif durant toute la durée de l'expérimentation.

Les sites de dissémination seront visités régulièrement par du personnel expérimenté d'Advanta France, pendant toute la durée des essais. Toute plante montant développant une hampe florale sera détectée précocement et sera détruite avant apparition des fleurs.

F. INFORMATIONS CONCERNANT LA DISSEMINATION

1. Objectif de la dissémination

Le programme expérimental a pour objectif la validation en conditions agronomiques réelles d'un nouveau concept de résistance, à long terme, au virus de la rhizomanie (le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave, BNYVV).

Le dispositif expérimental proposé pour la période 2003-2006 est essentiel pour confirmer que:

1. le mécanisme escompté peut assurer un blocage rapide de la multiplication et de la diffusion du virus dans les racines de betterave en conditions d'infection naturelles;
2. l'expression de la séquence testée conduit à rendre les plantes résistantes à différentes souches de virus BNYVV;
3. l'expression constitutive de la séquence testée conduit à rendre les plantes immunes tout au long de la saison dans des conditions agronomiques variées;
4. l'expression de la séquence testée permet de restaurer le rendement de la plante.

Les deux évènements de transformation ont été produits à titre expérimental. Ils ne sont pas destinés à un développement ultérieur.

2. Date et durée prévues de l'expérimentation

Les hybrides seront semés à partir du 15 mars 2003. Les racines seront récoltées en septembre, avant le début de la campagne sucrière.

Les campagnes des années suivantes se dérouleront de mars à septembre

3. Méthode de dissémination envisagée

Les hybrides issus des événements de transformation portant la séquence P15-4, ainsi que les contrôles non transgéniques, seront semés dans les parcelles d'essai au moyen d'un semoir de précision. Le matériel utilisé pour le semis sera nettoyé sur le site d'essai et les graines récupérées seront emballées hermétiquement et seront envoyées à SES-Europe, à Tienen en Belgique pour y être détruites.

L'essai comprendra des micro-parcelles de 10m² dont les betteraves seront récoltées et analysées. Ce type de dispositif est couramment utilisé par les sélectionneurs de betterave sucrière pour évaluer le rendement potentiel de lignées et d'hybrides.



Comme toute culture de betterave, l'essai sera constitué des betteraves végétatives. Aucune plante ne pourra fleurir. Des visites hebdomadaires seront organisées par des employés qualifiés d'Advanta pour détecter et arracher, avant floraison, toute betterave développant une hampe florale.

Au terme de l'expérimentation, les betteraves seront récoltées mécaniquement. : les betteraves de chaque parcelle seront decolletées, arrachées, lavées et pesées. Elles seront ensuite débitées en morceaux et des échantillons de pulpe représentatifs de la population de betterave de chaque parcelle, seront prélevés et mis en barquettes scellées. Toutes ces opérations seront réalisées sur le champ d'essai au moyen d'un dispositif mobile utilisé par Advanta pour la récolte et l'échantillonnage de parcelles de sélection.

Les échantillons de pulpe seront congelés et envoyés au laboratoire de SES-Europe, à Tienen en Belgique, pour y réaliser les analyses courantes permettant d'évaluer le potentiel de rendement d'hybrides de betteraves. De plus, un test Elisa spécifique (Torrance *et al.*, 1996) pratiqué sur les échantillons de pulpe permettra de déterminer la quantité de virus BNYVV présente dans les racines.

4. Préparation du site et culture

Le site d'essai sera préparé et cultivé selon les techniques habituellement utilisées dans un programme de sélection de betterave sucrière. L'essai sera entouré par une bordure sans betterave, d'une largeur d'au moins 6m qui l'isolera des cultures environnantes

Comme toute culture de betterave, l'essai sera constitué des betteraves végétatives. Aucune plante ne pourra fleurir. Des visites hebdomadaires seront organisées par des employés qualifiés d'Advanta pour détecter et arracher, avant floraison, toute betterave développant une hampe florale.

Au terme de l'expérimentation, les betteraves seront récoltées mécaniquement. Les feuilles, les collets et les morceaux de racines seront laissés à la surface de l'essai pour être ensuite enfouis dans le sol mécaniquement.

5. Nombre approximatif de plantes

La densité de peuplement sera approximativement de 90.000 plantes par hectare. Il y aura au maximum 4000 plantes transgéniques sur l'essai après démariage des parcelles.

G. INFORMATIONS SUR LES PLANS DE SURVEILLANCE, DE CONTRÔLE ET DE TRAITEMENT DU SITE ET DES DÉCHETS APRÈS DISSÉMINATION

1. Précautions prises

1.1 Isolement

Comme toute culture de betterave, l'essai comprendra des betteraves végétatives. Aucune plante ne pourra fleurir. Des visites hebdomadaires seront organisées pour détecter et détruire, avant floraison, toute betterave développant une hampe florale.

De plus, l'essai sera entouré par une bordure sans betterave, d'une largeur d'au moins 6m qui l'isolera des cultures environnantes.

1.2 Suivi

Un protocole détaillé sera élaboré par le responsable scientifique du projet, avant la mise en place de l'expérimentation, et sera communiqué au responsable technique en charge de l'essai. Ce protocole décrira toutes les opérations à réaliser dans les parcelles, les prises de notations et d'échantillons, et les mesures particulières relatives à l'expérimentation en plein champ de betteraves génétiquement modifiées.

Toute opération non explicitement décrite dans le protocole fera l'objet d'une autorisation préalable par le responsable scientifique de l'essai.

L'essai sera mis en place et sera régulièrement suivi par du personnel qualifié d'Advanta.

Les traitements du site, non mentionnés explicitement dans le présent document, seront conformes aux techniques classiques de culture betteravière.

2. Description des méthodes de traitement du site après dissémination

Au terme de l'expérimentation, les betteraves seront récoltées mécaniquement : les betteraves de chaque parcelle seront decolletées, arrachées, lavées et pesées. Elles seront ensuite débitées en morceaux et des échantillons de râpure (pulpe) représentatifs de la population de betterave de chaque parcelle, seront prélevés et mis en barquettes scellées. Toutes ces opérations seront réalisées sur le champ d'essai au moyen d'un dispositif mobile utilisé par Advanta pour la récolte et l'échantillonnage de parcelles de sélection.

Les échantillons de pulpe utilisés pour réaliser les analyses courantes permettant d'évaluer le potentiel de rendement d'hybrides de betteraves. De plus, un test Elisa spécifique pratiqué sur les échantillons de pulpe permettra de déterminer la quantité de virus BNYVV présente dans les racines.

A la récolte, les résidus de plantes seront broyés en enfouis sur la parcelle.

Le site d'expérimentation ne sera pas utilisé pour y cultiver de la betterave au cours des deux années suivant l'essai de champ.

Les deux années suivant l'essai de champ, les seules cultures autorisées sur le site d'expérimentation seront celles faisant appel à des herbicides létaux pour la betterave (par exemples, céréales).

Le site de l'essai sera visité régulièrement pendant les deux années suivant l'expérimentation par du personnel qualifié d'Advanta.

Pendant l'expérimentation et au cours des deux années suivantes, toute repousse de betterave qui apparaîtrait sur la surface de l'essai sera immédiatement détruite.

3. Description des méthodes de traitement du matériel et déchets issus des plantes génétiquement modifiées après dissémination

Conformément aux procédures d'Advanta relatives à l'expérimentation en plein champ de betteraves génétiquement modifiées, l'excédent de semences récolté dans le semoir après le semis, sera envoyé au laboratoire de SES Europe à Tienen, Belgique, pour y être détruit.

Les betteraves qui auraient développé une hampe florale seront arrachées, détruites mécaniquement et laissées entre les parcelles.

A la récolte, à l'exception des échantillons de pulpe de racines qui seront conditionnés en barquettes scellées, congelés et envoyés à SES-Europe pour les analyses de rendement, et de quelque échantillons de feuilles et de racines prélevés à des fins expérimentales, tout le matériel végétal provenant des plantes de l'essai (feuilles, collets et morceaux de racines) et les eaux usées utilisées pour nettoyer les racines à la récolte, seront laissés sur le site d'expérimentation et seront incorporés au sol.

4. Description des plans et des techniques de surveillance

Un protocole détaillé sera élaboré par le responsable scientifique du projet, avant la mise en place des expérimentations, et sera communiqué au responsable technique en charge de l'essai. Ce protocole décrira toutes les opérations à réaliser dans les parcelles, les prises de notations et d'échantillons, et les mesures particulières relatives à l'expérimentation en plein champ de betteraves génétiquement modifiées.

Toute opération non explicitement décrite dans le protocole fera l'objet d'une autorisation préalable par le responsable scientifique du projet.

L'essai sera mis en place et sera régulièrement suivi par du personnel qualifié d'Advanta. La conformité de l'expérimentation aux conditions décrites dans ce dossier et dans l'autorisation du Ministère de l'Agriculture sera contrôlée par des agents assermentés de la Protection de Végétaux.

Pendant l'expérimentation, toute plante de betterave développant une hampe florale sera immédiatement identifiées et détruite, avant floraison. Un suivi hebdomadaire sera organisé pour contrôler les parcelles.

Au cours des deux années suivant la dissémination, le site de l'essai sera visité par l'équipe technique d'Advanta et toute repousse de betterave qui apparaîtrait à la surface des essais sera arrachée, avant apparition de la hampe florale, et envoyée au laboratoire de SES Europe, à Tienen en Belgique, pour y être analysée.

5. Description des plans d'urgence

Des visites régulières seront réalisées par du personnel qualifié d'Advanta durant toute la durée de l'essai. Elles permettront de garantir que tout événement imprévu soit identifié de manière précoce (accident climatique, vandalisme, comportement anormal du matériel, ..).

En cas de besoin, des méthodes de destruction volontaire pourraient être utilisées. Les parcelles de l'essai pourraient être détruites par application d'un herbicide adapté et suivi d'un broyage mécanique

Ces procédures d'urgence impliqueraient l'information et l'accord préalable du Ministère de l'Agriculture et les constatations d'usage par des agents de la Protection des Végétaux.

H. INFORMATIONS SUR LES EVENTUELLES INCIDENCES DE LA DISSEMINATION DES PLANTES GENETIQUEMENT MODIFIEES SUR L'ENVIRONNEMENT

1. Probabilité des plantes génétiquement modifiées à devenir plus persistantes que les plantes parentales ou réceptrices ou à se propager plus rapidement dans les habitats naturels.

Les données disponibles sur les géotypes choisis, indiquent qu'il est peu probable que la modification génétique altère le potentiel de survie de la betterave dans l'environnement, mis à part les propriétés de résistance à la rhizomanie et au glufosinate.

La morphologie des plantes génétiquement modifiées ainsi que leur cycle et leur mode de reproduction sont identiques à ceux de plantes non transgéniques cultivées dans des conditions similaires.

Ce dossier décrit des essais de betteraves végétatives qui seront récoltées et détruites à la fin de l'expérimentation. Il est prévu de vérifier à la fin de l'essai et durant les deux années suivant la dissémination qu'aucune plante de betterave ne repousse sur les sites d'expérimentation.

Le site des essais sera l'écosystème agricole. Aucun effet particulier des plantes modifiées sur l'environnement existant, n'est attendu, mis à part ceux inhérents à toute culture de racines de betteraves.

2. Avantages ou inconvénients sélectifs conférés aux autres espèces végétales sexuellement compatibles, qui peuvent résulter du transfert de matériel génétique de la plante génétiquement modifiée.

Les essais de rendement de betterave sucrière sont des essais de plantes végétatives.

Comme les plantes en essai ne pourront pas fleurir il ne pourra pas y avoir de transfert de matériel génétique vers d'autres espèces végétales sexuellement compatibles, en particulier vers des betteraves adventices.

Compte tenu du suivi mis en place pendant les essais et durant les deux années suivant les disséminations, le risque de transfert de matériel génétique vers d'autres espèces sexuellement compatibles est considéré négligeable.

3. Incidence écologique éventuelle des interactions entre la plante génétiquement modifiée et les organismes ciblés.

Les essais seront situés dans des zones infectées par le virus BNYVV. Dans ces zones, seules des variétés de betteraves résistantes à la rhizomanie sont cultivées.

La stratégie explorée dans ce projet consiste à rendre la plante résistante au BNYVV en

empêchant le mouvement du virus de cellule à cellule.

La séquence virale utilisée pour la transformation de la betterave a été modifiée pour que le produit pour lequel il code soit différent de la protéine originale issue du virus et soit donc non-fonctionnel

L'hypothèse quant au mode d'action est que la protéine non fonctionnelle entre en compétition avec la protéine P15 du virus 'sauvage' pour la formation d'un complexe avec les autres protéines virales du TGB ou avec certains composants cellulaires du complexe.

Cette séquence modifiée (P15-4) insérée dans la betterave confère une forte résistance au virus BNYVV en bloquant les mécanismes de translocation du virus au sein de la plante et plus particulièrement de la racine.

Il est peu probable que, les essais aient une incidence écologique sur le virus BNYVV.

4. Incidence écologique éventuelle d'interactions possibles avec les organismes non ciblés

Il ne devrait y avoir avec d'autres organismes aucune interaction qui pourrait avoir un impact environnemental différent de celui d'un champ de betteraves non modifiées.

Le risque global sur l'environnement, lié à la réalisation de cet essai, est considéré négligeable.

La liste complète des références scientifiques utilisées pour la réalisation de ce document a été communiquée aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire.