



**Fiche d'information publique concernant la dissémination
volontaire de betteraves sucrières génétiquement modifiées.**

Notifiant

SES EUROPE - ADVANTA
Soldatenplein Z2, n°15
3300 Tienen

Tel : 016/80 83 81
Fax : 016/80 82 63

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 sucrières
modifiées génétiquement pour résister à la rhizomanie - 2002**

Numéro d'enregistrement du dossier :

B/BE/02/V3

La dissémination d'organismes génétiquement modifiés (OGMs) dans l'environnement est strictement réglementée au niveau européen par la directive 90/220/CEE (récemment remplacée par la directive 2001/18/CE du 12 mars 2001) et au niveau belge par l'Arrêté Royal (AR) de 18 décembre 1998 « relatif à la réglementation de l'introduction volontaire dans l'environnement ainsi que la mise sur le marché des OGMs ou des produits en contenant ». Pour garantir l'utilisation sans risque des OGMs, les deux textes de loi stipulent entre autres que la dissémination d'OGMs à titre expérimental est interdite sans l'autorisation préalable écrite du ministre compétent. L'octroi d'un accord dépend d'une évaluation minutieuse de la biosécurité de la dissémination projetée (évaluation de risque) à faire par le Conseil de Biosécurité.

Afin d'obtenir l'autorisation nécessaire du ministre compétent, la société SES Advanta a introduit un dossier de demande d'autorisation auprès du service compétent à savoir l'Inspection générale des Matières premières et des Produits transformés du Ministère des Classes moyennes et de l'Agriculture. Après un avis positif (sous conditions) du Conseil de Biosécurité, le ministre compétent a décidé d'accorder l'autorisation à la société SAS Advanta pour faire des expérimentations avec des betteraves sucrières transgéniques en 2002, comme décrites dans la demande B/BE/02/V3.

La dissémination est prévue sur un site en Flandre situé en territoire de la municipalité de Verrebroek et suivra la période culturale normale de la betterave sucrière qui s'étend du mois d'avril au mois d'octobre.

TABLE DES MATIERES

1. DESCRIPTION DE LA PLANTE GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉE

2. BUT DE L'EXPÉRIENCE

3. REVUE DES ACTIVITÉS ANTÉRIEURES ET FUTURES

4. AVANTAGES POUR LE MILIEU, L'AGRICULTEUR OU LE CONSOMMATEUR

5. BIOLOGIE ET CYCLE DE VIE DE LA PLANTE

6. EFFETS POTENTIELS OU RISQUES POUR L'ENVIRONNEMENT

6.1. Croisement et dissémination dans l'écosystème naturel

- 6.1.1. Dissémination du transgène par le pollen
- 6.1.2. Dissémination du transgène par les semences
- 6.1.3. Avantage sélectif
- 6.1.4. Stockage de la culture

6.2. Interaction avec les organismes ciblés

6.3. Interaction avec des organismes non ciblés

6.4. Impact d'une utilisation à grande échelle et à long terme

7. MESURES PRISES POUR ASSURER LE CONFINEMENT, CONTRÔLE ET LE SUIVI

7.1. Contrôle de la dissémination de pollen

7.2. Contrôle de la dissémination de semences

7.3. Contrôle du stockage des betteraves (suivi, monitoring et traitements après récolte)

8. DESTRUCTION DU MATÉRIEL TRANSGÉNIQUE

9. PLAN D'URGENCE

10. INSPECTION

11. RAPPORT D'ACTIVITÉ

12. ASPECTS SOCIO-ÉCONOMIQUES

13. LISTE DE RÉFÉRENCES

14. DICTIONNAIRE EXPLICATIF

1. Description de la plante génétiquement modifiée

La betterave sucrière (*Beta vulgaris*) est une plante de la famille des *Chenopodiaceae*. Cette plante cultivée pour sa racine riche en sucre est une des cultures principales des régions européennes (Est et Ouest). Elle représente une composante importante de la rotation des cultures en agriculture et contribue significativement au revenu des agriculteurs.

Les betteraves décrites dans ce projet ont été transformées pour résister à la Rhizomanie, une maladie virale provoquée par un furovirus, le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave (BNYVV: beet necrotic yellow vein virus) (Tamada et Baba, 1973, Kuszala et Putz, 1977), qui est transmis par le champignon du sol *Polymyxa betae* à la racine de la betterave (Keskin, 1964).

Les betteraves ont aussi intégré le gène synthétique *pat* (Wohlleben *et al.*, 1988) qui confère la résistance à l'herbicide glufosinate. Ce gène a été utilisé comme marqueur de sélection lors des étapes de transformation et de sélection des plantes en culture *in vitro*.

Importance de la rhizomanie

La rhizomanie de la betterave sucrière est actuellement le problème sanitaire majeur de la culture betteravière dans le monde (Valentin *et al.*, 1995). 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, aux Pays-Bas et en Belgique (Asher, 1993).

Parallèlement à sa progression en Europe elle a été observée dans la plupart des régions du monde, par exemple au Japon (Tamada *et al.*, 1971) aux Etats-Unis (Duffus *et al.*, 1984) et en Chine (Gao *et al.*, 1983).

Le rendement de 60-70 tonnes de racines à l'hectare en zone saine, peut chuter jusqu'à 20 tonnes dans les parcelles contaminées par le virus. 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 (Valentin *et al.*, 1995).

Biologie du virus

Le BNYVV est un virus constitué de cinq 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 répllication de l'ARN viral, l'assemblage, le

mouvement et la transmission du virus. Les ARN 3, 4 et 5 sont nécessaires au développement de la maladie dans la betterave et à son cycle dans le champignon vecteur *Polymyxa betae* (Richards et Tamada, 1992; Tamada, 1999).

La majorité des souches de BNYVV identifiées à ce jour peuvent être classées, par analyse moléculaire, en deux groupes majeurs, les types A et B. Le BNYVV de type A se trouve dans la plupart des pays européens dont la Belgique, aux Etats Unis, en Chine et au Japon. Le BNYVV de type B est 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 (Koenig *et al.*, 1997; Kiguchi *et al.*, 1996). Des tests d'inoculation réalisés 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 (Tamada *et al.*, 1996).

Cette souche très agressive contenant l'ARN 5, aussi dénommée Pathotype P, est présente en France dans la région de Pithiviers.

Stratégie génétique développée dans le projet

Comme dans d'autres furovirus, le mouvement du virus de cellule à cellule est gouverné par trois gènes situés sur l'ARN2. Ils forment un bloc ('cluster') connu sous le nom de 'triple gene block' (TGB) (Gilmer *et al.*, 1992) 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.

L'étude détaillée de ce mécanisme fondamental conduit à proposer une nouvelle stratégie de résistance au BNYVV.

La stratégie 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' qui est 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 (Lauber *et al.*, 2001).

Le gène P15 sauvage a été modifié afin que la protéine qu'il produit aie perdu toute fonctionnalité viv à viv du virus. Parallèlement, le gène P15 a été sélectionné pour que son expression entraîne l'arrêt de la multiplication du BNYVV dans la racine de la betterave.

Compte tenu du mécanisme de mouvement mis en oeuvre par les protéines issues des séquences du TGB, il semble que l'expression dans la plante de la séquence P15 mutée, 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 prévient l'interaction avec certains sites ou composants cellulaires.

2. But de l'expérience

Les transformants expérimentaux décrits dans ce document expriment une séquence correspondant à la protéine P15 modifiée du BNYVV.

L'essai de champ proposé pour la saison 2002 est essentiel pour établir en conditions agronomiques réelles si:

- (1) le mécanisme escompté peut assurer un blocage rapide de la multiplication et de la diffusion du virus dans les racines de betterave en condition d'infection naturelle;
- (2) l'expression constitutive des séquences testées conduit à rendre les plantes résistantes tout au long de la saison;
- (3) l'expression des séquences testées permet de restaurer un rendement complet de la plante.

3. Revue des activités antérieures et futures

Utilisation des sources de résistance issues du genre Beta

Comme il n'existe pas de méthode efficace pour contrôler à grande échelle la propagation de la rhizomanie par des moyens chimiques ou physiques (Henry *et al.*, 1992), les efforts de la sélection végétale traditionnelle 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. Ces variétés ont représenté 23% des ventes de semences de betteraves en 1999 et la progression ne cesse de s'amplifier puisque ces variétés auraient représenté 32% des ventes de semences de betterave sucrière en 2000 (La Technique betteravière, 1999).

En Belgique, les premières variétés tolérantes ont été commercialisées en 1998 et elles ont représenté 2 % des ventes de semences de betterave en 2001.

Il existe différentes sources de résistance à la rhizomanie issues du genre *Beta* (Whitney, 1989). Cependant, peu d'études semblent indiquer que les gènes de tolérance utilisés actuellement interviennent dans des mécanismes de résistance distincts.

La progression très rapide de la maladie dans les zones de culture betteravière et la découverte d'une souche de virus BNYVV beaucoup plus agressive (le pathotype P) justifient de diversifier les souches et les mécanismes de résistance, de façon à établir, en les utilisant séparément ou en combinaison, une stratégie de résistance à long terme à ce virus.

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

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 (Powell *et al.*, 1986; Fritchen et Beachy, 1993; Wilson, 1993).

Une des stratégies largement décrite concerne l'utilisation de séquences de gènes codant pour la protéine de capsid du virus visé (CP ou 'Coat protein'), qui, placées sous le contrôle de séquences régulatrices appropriées, sont exprimées dans la plante.

Dans le cas de la betterave, l'expression de la séquence de la protéine de la capsid du BNYVV a été reportée par Kallerhof *et al.*, 1990, Ehlers, 1991, Kraus *et al.*, 1994 et dans le brevet WO91/13159. Ces rapports ne donnent cependant que peu de données quant aux niveaux de résistance observés lorsque les betteraves sont cultivées en terre rhizomaniée.

Le dossier B/BE/02/V3 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.

Stratégie 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 nécessaires au développement de la maladie et à son cycle dans le vecteur du BNYVV, le *Polymyxa betae* (Richards et Tamada, 1992; Tamada, 1999).

Comme dans d'autres furovirus, le mouvement du virus de cellule à cellule est gouverné par trois gènes situés sur l'ARN2. Ils forment un bloc ou 'cluster' connu sous le nom de 'triple gene block' (TGB) (Gilmer *et al.*, 1992) 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 modifié de sorte que son expression dans la plante perturbe et prévienne le mouvement du virus de cellule à cellule (Lauber *et al.*, 2001).

Des plantes transgéniques exprimant ce type de gène codant pour une des protéines du TGB ont développé de la résistance vis-à-vis du virus visé. C'est le cas du virus de la mosaïque du trèfle blanc (WCLMV) et du virus X de la pomme de terre (PVX) (Beck *et al.*, 1994; Seppänen *et al.*, 1997).

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. Différentes modifications ont été obtenues et comparées.

Ces séquences ont été insérées dans le génome de betterave par transformation. Les transformants primaires obtenus ont été mis en culture en chambre de culture, dans du sol rhizomanié, et le niveau d'infection par le virus a été mesuré dans les racines au terme de l'expérience. Certains transformants primaires se sont révélés être très résistants à l'infection par le BNYVV dans le dispositif de bio-essais réalisés en conditions contrôlées (Lauber *et al.*, 2001). Une séquence modifiée en particulier a été retenue.

Compte tenu du mécanisme de mouvement mis en oeuvre par les protéines issues des séquences du TGB, il semble que l'expression dans la plante de la séquence P15 mutée, 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 prévient l'interaction avec certains sites ou composants cellulaires.

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

En 2001, des hybrides de première génération dérivés des transformants primaires les plus résistants ont été testés au champ en France (permis B/FR/01/02/02).

Cette expérience devrait être répétée de façon à vérifier dans différentes conditions agronomiques que les deux événements de transformation sélectionnés confèrent aux hybrides et aux lignées qui en sont dérivés une résistance stable au BNYVV durant toute la culture.

Deux expérimentations sont envisagées en 2002, l'une en France sous le permis B/FR/01/02/02 et l'autre en Belgique dans le cadre du dossier B/BE/02/V3.

4. Avantages pour le milieu, l'agriculteur ou le consommateur

La rhizomanie de la betterave sucrière est actuellement le problème sanitaire majeur de la culture betteravière dans le monde (Valentin *et al.*, 1995). Le rendement de 60-70

tonnes de racines à l'hectare en zone saine, peut chuter jusqu'à 20 tonnes dans les parcelles contaminées par le virus. 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 (Valentin *et al.*, 1995).

La gravité de cette maladie est due en grande partie à son caractère endémique entraînant son extension par le sol dans les 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 (Henry *et al.*, 1992), 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 ont été utilisés avec succès par les sélectionneurs de betterave sucrière.

Depuis 1986, des variétés tolérantes à la rhizomanie ont été diffusées sur le marché, sauvant la culture betteravière dans des zones infectées qui étaient prêtes à l'abandonner. Cependant, peu d'études semblent indiquer que, bien qu'issus de différentes sources de betteraves sucrières ou de betteraves sauvages (Whitney, 1989), les gènes de tolérance utilisés actuellement interviennent dans des mécanismes de résistance distincts.

La rhizomanie ne cesse de progresser dans les différents pays d'Europe. En France, le pourcentage de la surface betteravière infectée par le virus est passé de 39% en 1999 à 46% en 2000. Aux Pays-Bas, la présence de rhizomanie a été rapportée dans diverses zones par Heijbroek (Heijbroek, 1984; Heijbroek, 1989).

En Belgique, la maladie n'était trouvée, dans le passé, que dans la région d'Anvers (Wauters, 1996), mais depuis 1995, des sources d'infection ont été identifiées dans différentes régions du pays (Wauters *et al.*, 1996) et il est probable que cette progression va s'intensifier dans les prochaines années.

Dans notre pays, la vente de variétés tolérantes à la rhizomanie a représenté 2% des ventes de semences de betterave sucrière en 2001.

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

5. Biologie et cycle de vie de la plante

La betterave sucrière 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 de montaison de la hampe florale et finalement, après fécondation, la production de graines (Cooke and Scott, 1992).

Dans les conditions normales de cultures, les betteraves sucrières cultivées pour la production de racines restent végétatives; elles ne fleurissent pas et ne produisent pas de graines.

De même, les betteraves mises en essais dans le cadre du dossier B/BE/02/V3 resteront à l'état végétatif pendant toute la saison 2002. Les racines seront récoltées en septembre 2002, avant la période de vernalisation et d'induction de la floraison.

6. Effets potentiels ou risques pour l'environnement

6.1. Croisement et dissémination dans l'écosystème naturel

6.1.1. Dissémination du transgène par le pollen

Comme dans toute culture de racines de betteraves, les plantes en essai ne pourront pas fleurir. Il n'y aura donc pas d'émission de pollen.

Le risque de transfert de matériel génétique vers d'autres espèces sexuellement compatibles est considéré comme nul.

6.1.2. Dissémination du transgène par les semences

Les plantes mises en essai resteront végétatives durant toute la saison. Un plan de surveillance est mis en place pour que toute plante qui monterait à graines soit détectée bien avant floraison.

Le risque de dissémination des transgènes par les semences est donc considéré comme nul.

6.1.3. Avantage sélectif

Il est peu probable que la modification génétique altère le potentiel de survie de la betterave dans l'environnement ou sa capacité de dissémination, si on excepte la résistance au BNYVV et la résistance à l'herbicide glufosinate.

6.1.4. Stockage de la culture

Au terme de l'expérimentation, les betteraves seront récoltées mécaniquement : les plantes de chaque parcelle seront décolletées, 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 emballés 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 d'essais de rendement.

Les échantillons de pulpe seront congelés et envoyés au laboratoire de SES Europe, à Tienen, pour y réaliser les analyses courantes permettant d'évaluer le potentiel de rendement et les paramètres de qualité d'hybrides de betteraves.

A la récolte, 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.

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 seules cultures autorisées sur le site d'expérimentation seront celles faisant appel à des herbicides létaux pour la betterave (ex. Céréales).

6.2. Interaction avec les organismes ciblés

Il est peu probable que, la modification génétique aie une incidence écologique sur le virus BNYVV.

En effet, la stratégie explorée dans ce projet consiste à rendre la plante résistante 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 muté de sorte que son expression dans la plante perturbe et prévienne le mouvement du virus de cellule à cellule (Lauber *et al.*, 2001). Cependant, afin d'être inopérant auprès du virus, le gène P15 du virus BNYVV 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 vis à vis du virus.

L'hypothèse formulée 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 prévient les interactions avec certains composants cellulaires.

La séquence P15 modifiée 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.

6.3. Interaction avec des 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 pour l'environnement, lié à la réalisation de cet essai, est considéré comme négligeable.

6.4. Impact d'une utilisation à grande échelle et à long terme

Les événements de transformation décrits dans le dossier B/BE/02/V3 sont à vocation strictement expérimentale. Ils ont été développés pour tester l'efficacité de la séquence P15 modifiée du virus BNYVV à conférer à la betterave sucrière la résistance à ce virus.

Le gène P15 du virus BNYVV 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 auprès du virus.

Les données générées dans le cadre de ce projet doivent contribuer à évaluer l'opportunité de poursuivre le développement de cette technologie. L'évaluation de l'impact d'une utilisation à grande échelle ou à long terme n'entre pas dans le cadre de ce dossier.

7. Mesures prises pour assurer le confinement, contrôle et le suivi

Un protocole détaillé sera élaboré, 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.

Un cahier de champ permettra à l'équipe technique en charge de la réalisation de l'essai de consigner toutes les opérations réalisées dans les parcelles et de les faire valider par le responsable technique.

7.1. Contrôle de la dissémination de pollen

L'expérimentation consiste à cultiver les betteraves pour leurs racines. Les plantes transgéniques mises en essai resteront au stade végétatif.

Des visites hebdomadaires sont prévues sur le site de l'essai. Toute plante qui commencerait à développer une hampe florale sera détectée rapidement et sera détruite bien avant floraison. Il n'y aura pas de dissémination de pollen.

7.2. Contrôle de la dissémination de semences

Voir 7.1. Il n'y aura pas de dissémination de semences sur le site de l'essai.

7.3. Contrôle du stockage des betteraves (suivi, monitoring et traitements après récolte)

A la récolte, 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.

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 seules cultures autorisées sur le site d'expérimentation seront celles faisant appel à des herbicides létaux pour la betterave (par exemple, culture de céréales).

Le site de l'essai sera visité 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.

Si cela se révèle nécessaire, les repousses de matériel génétiquement modifié pourraient être identifiées de différentes façons :

- des analyses moléculaires de type "Southern" ou PCR sur le matériel végétal permettent de démontrer la présence de l'ADN inséré et d'identifier l'événement de transformation.
- si elles sont pulvérisées de glufosinate-ammonium, les betteraves modifiées survivent alors que les 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 (Torrance *et al.*, 1996) pratiqué sur les racines latérales par exemple, permet de déterminer le niveau d'infection par le virus BNYVV dans les racines. Ce test permet d'identifier les plantes sensibles et résistantes à la rhizomanie. Les plantes génétiquement modifiées cultivées en sol rhizomanié devraient montrer des quantités significativement moins élevées de virus que des témoins non transgéniques, non résistants à la rhizomanie, cultivés dans les mêmes conditions.

Les traitements des sites, non mentionnés explicitement ci-dessus, seront conformes aux techniques classiques de culture betteravière.

8. Destruction du matériel transgénique

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

Les betteraves arrachées lors du démariage seront laissées sur le site expérimental, 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, 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.

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 seules cultures autorisées sur le site d'expérimentation seront celles faisant appel à des herbicides létaux pour la betterave (par exemples, céréales).

9. Plan d'urgence

Des visites hebdomadaires 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.

L'essai est un essai de betteraves végétatives. Cependant, toute betteraves

(transgénique ou non transgénique) qui monterait à graines sera détectée et arrachée bien avant floraison.

En cas de besoin, les plantes de l'essai pourraient être détruites par application d'un herbicide adapté (par exemple, metsulfuron-méthyl ou glyphosate).

10. Inspection

L'Inspection générale des Matières premières et des Produits finis est chargée en Belgique du contrôle des essais de champ de plantes génétiquement modifiées. Afin de planifier ces contrôles, le notifiant est obligé d'informer à l'avance le service concerné des dates de semis et de récolte. Sur le terrain, les contrôleurs veillent à ce que les opérations de semis et de récolte se déroulent en accord avec les autorisations ministérielles et les protocoles en place. En outre, les contrôleurs prélèvent des échantillons de matériel végétal qui seront analysés dans les laboratoires officiels.

11. Rapport d'activité

A la fin de la saison de culture, le notifiant doit transmettre un rapport d'activité au service concerné, l'Inspection générale des Matières premières et des Produits finis au plus tard le 31/12/02. Ce rapport d'activité doit au moins comprendre des informations qui suivent:

- Une copie du cahier de champ
- La place et la dissémination
- La nature précise des transformants disséminés
- La surface précise de la parcelle d'essai
- Les objectifs de l'essai
- La fréquence et la nature des observations menées dans la parcelle d'essai
- Les mesures prises pour éviter la dissémination involontaire du transgène hors de la parcelle d'essai
- La méthode utilisée pour la destruction de la récolte et son efficacité
- Les résultats de l'expérimentation
- Une description du plan de surveillance de la parcelle

12. Aspects socio-économiques

La rhizomanie ne cesse de progresser dans les différents pays d'Europe. En France, le pourcentage de la surface betteravière infectée par la virus est passé de 39% en 1999 à 46% en 2000. Aux Pays-Bas, la présence de rhizomanie a été reportée dans diverses zones par Heijbroek (Heijbroek, 1984 and Heijbroek, 1989).

En Belgique, depuis 1995, des sources d'infection ont été identifiées dans différentes régions du pays (Wauters *et al.*, 1996) et il est probable que cette progression va s'intensifier dans les prochaines années, comme cela a été observé chez nos voisins français et hollandais.

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 (Henry *et al.*, 1992), 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 ont été utilisés avec succès par les sélectionneurs de betterave sucrière.

Depuis 1986, des variétés tolérantes à la rhizomanie ont été diffusées sur le marché, sauvant la culture betteravière dans des zones infectées qui étaient prêtes à l'abandonner. La betterave sucrière est en effet une composante essentielle de la rotation et contribue significativement au revenu des agriculteurs.

Cependant, peu d'études semblent indiquer que, bien qu'issus de différentes sources de betteraves sucrières ou de betteraves sauvages (Whitney, 1989), les gènes de tolérance utilisés actuellement interviennent dans des mécanismes de résistance distincts.

La progression très rapide de la maladie dans les zones de culture betteravière et l'apparition récente de souches de virus particulièrement virulentes démontrent qu'il y a intérêt à diversifier les mécanismes de résistance, de façon à établir, en les utilisant séparément ou en combinaison une stratégie de résistance à long terme au BNYVV.

La nouvelle stratégie explorée dans ce projet vise à rendre la betterave résistante à la rhizomanie en bloquant le mouvement du virus dans la plante. Les premiers résultats obtenus avec les transformants primaires et des hybrides de première génération indiquent que la séquence virale modifiée confère une résistance stable au BNYVV tout au long de la culture.

Des expérimentations en plein champ sont maintenant nécessaires pour vérifier en conditions agronomiques réelles que le mécanisme impliqué bloque la multiplication du virus et permet d'obtenir un rendement en sucre normal.

13. Liste de références

- Abe J., Guan G-P., Shimamoto Y. (1994) A gene model for bolting in sugar beet. Proc.Japan Soc.Sugar beet technologists 36 , 152-157.
- Asher M. (1993) Rhizomania in the sugar beet crop. ed. D.A. Cooke and R.K. Scott, Chapman & Hall, London, 312-338.
- Dufus JE., Whitney RC., Larsen RC., Lin H. Lewellen R. (1984) First report in the western hemisphere of rhizomania of sugar beet caused by beet necrotic yellow vein virus. Pl Dis. 68 : 251.
- Elhers U. (1991) Cloning of coat protein gene of the beet necrotic yellow vein virus and its expression in sugar beet hairy root . Theoretical and Applied genetic. 81, 777-782.
- Fitchen J. and Beachy R. (1993) Genetically engineered protection against viruses intransgenic plants. Ann. Rev. Microbiol. 47, 739-763.
- Gao J., Deng F., Zhai H. , Ling X., Liu H. (1983) The occurrence of beet necrotic yellow vein virus in China. Acta Phytopathol Sin. 13 :1-4.
- Gilmer D., Bouzoubaa S., Hehn A., Guilley H. (1992) Efficient cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA2. Virology 189, 40-47.
- Heijbroek W.1984 Distribution of the BNYVV in The Netherlands, Proceedings 1st International conference of Sugar beet virologists, Colmar, 95-96.
- Heijbroek W., 1989. The development of Rhizomania in two areas of the Netherlands and its effect on sugar beet growth quality. Neth. J. Pl. Path. 95, 27-35.
- Henry C., Bell G., Hill S. (1992) The effect of methyl bromide fumigation on rhizomania inoculum in the field. Plant Pathology. 41 : 483-489.
- Kallerhoff J., Perez P., Bouzoubaa S., Ben Tahar S. (1990) Beet necrotic yellow vein virus coat protein-mediated protection in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts. Plant Cell Report 9, 224-228.
- Keskin B. (1964) *Polymyxa betae* n.sp., ein Parasit von den Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe. Archives of Microbiology. 49 : 348-374.

- Kiguchi T., Saito M., Tamada T. (1996) Nucleotide séquence analysis of RNA-5 of five isolates of beet necrotic yellow vein virus and the identity of a deletion mutant. *J Gen Virol* 77 : 575-580.
- Koenig R., Haerberle AM., Commandeur U. (1997) Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA 5 in a sugar beet growing area in Europe. *Arch Virol* 142 : 1499-1504.
- Kraus J., Holtschulte B., Mechelke W., Schulte-Kappert E. (1994) Field performance of transgenic sugarbeet plants expressing BNYVV coat protein plants. Fourth Int. Congress of Plant Molecular Biology, Int. Sic. for Plant Molecular Biology, Amsterdam.
- Kruse M., Koenig R., Hoffman A., Kaufmann A., Commandeur U, Solovyev A., Savenkov I., Burgermeister W. (1994) Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of beet necrotic yellow vein virus. *Journal of General virology*, 75, 1835-1842.
- Kuszala M. and Putz C. (1977) La rhizomanie de la betterave sucrière en Alsace;gamme d'hôtes et propriétés biologiques du BNYVV. *Ann.Phytopathology* 9 : 435-446.
- Lauber E., Bleykasten-Grosshans C., Erhardt M., Bouzoubaa S., Jonard G., Richards KE. and Guilley H. (1998) Cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus I. Heterologous complementation experiments provide evidence for specific interactions among the triple gene block proteins. *Molec Plant-Microbe Interact* 11, 618-625.
- Lauber E., Janssens L., Weyens G., Jonard G., Richards KE., Lefebvre M., Guilley H. (2001) Rapid screening for dominant negative mutations in the beet necrotic yellow vein virus triple gene block proteins P13 and P15 using a viral replicon. *Transgenic research* , 10, August 2001, 293-302
- Powell A., Nelson R., Rogers S., Fraley R. (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tomato mosaic virus coat protein gene. *Science* 232, 738-743.
- Richards K., Tamada T. (1992) Mapping functions on the multipartite genome of beet necrotic yellow vein virus *Annual Review of Phytopathology*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30, 291-313.

- Seppänen P., Puska R., Honkanen J., Tyulkina L., Fedorkin O., Morozov S. and Atabekov J. (1997) Movement protein –derived resistance to triple gene block-containing plant viruses. *J. Gen Virol* 78 : 1241-1246.
- Tamada T. (1999) Benyviruses. Webster RG, Granoff A (eds) *Encyclopedia of virology*, 2nd ed. Academic Press, New York (in press).
- Tamada T. and Baba T. (1973) Beet necrotic yellow vein virus from rizomania-affected sugar beet in Japan. *Annals of Phytopathological Society of Japan*. Vol 39, 325-332.
- Tamada T., Baba T. and Abe H. (1971) A virus isolated from sugar beet showing ‘rhizomania’ like symptoms and its transmission in soil. *Bull Sugar Beet Research Suppl* 13 : 179-186.
- Tamada, T., Kusume, T., Uchino, H., Kiguchi, T. and Saito, M. (1996). Evidence that Beet Necrotic Vein Virus RNA-5 is involved in symptom development of sugar-beet roots. *Proceedings of the third symposium of the international working group on plant viruses with fungal vectors*: 49-52.
- Torrance, L., Pead, M. and Buxton, G. (1988). Production and some characteristics of monoclonal antibodies against beet necrotic yellow vein virus. *Ann. Appl. Biol.* 113, 519-530
- Valentin P., Fonné G., Blech F., Gerst M., Reinbold C., Lemaire O., Merdinoglu D., Merdinoglu S., Putz C. (1995) La rhizomanie de la betterave : état actuel des connaissances *Cahiers Agricultures* 1995 ; 4 : 417-429.
- Wauters A. 1999 Rhizomania le danger existe. *Le betteravier*, Février 1999, 36.
- Wauters A., Maraite H., Steyers S. 1996 Extension de la rhizomanie en Belgique en 1995. *Le Betteravier* N° Février 1996, 48-49.
- Whitney E. (1989) Identification, distribution, and testing for resistance to rhizomania in *Beta maritima*. *Plant Disease* 73, 287-289.
- Wilson T. (1993) Strategies to protect crop plants against viruses – pathogen derived resistance bloccons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3134-3141.
- Wohlleben, W., Arnold W., Broer I., Hilleman D., Strauch E., Pühler A. (1988) Nucleotide sequence of the Phosphinotricin-N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridichromogenes* Tü 494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70, 25-37.

14. Dictionnaire explicatif

ARN :	acide ribo-nucléique
BNYVV:	'beet necrotic yellow vein virus', virus qui provoque la maladie des nervures jaunes et nécrotique de la betterave. Ce virus est transmis par un champignon du sol le <i>Plymyxa betae</i> à la betterave.
CP:	coat protein, protéine de la capsid d'un virus
Démariage:	opération consistant à ajuster, après la levée, la population de plantes dans une parcelle par arrachage des plantes excédentaires.
Furovirus:	<i>fungus rod shape virus</i> Classe de virus comportant des virus de plante. Les furovirus comprennent plusieurs particules de RNA
Na+:	ion sodium
K+:	ion potassium
P13, P42, P15:	protéines impliquées dans la formation d'un complexe spécifique indispensable au mouvement de cellule à cellule du BNYVV.
TGB:	<i>triple gene block</i> Ensemble de trois gènes de l'ARN 2 du BNYVV impliqués dans le mouvement de cellule à cellule du virus.
Replicon:	système 'vecteur d'expression' basé sur l'utilisation des séquences d'ARN non codantes d'un virus pour exprimer des protéines en dehors de leur contexte normal.