

**Dossier de demande d'avis pour une expérimentation hors
confinement de plants de vigne transgéniques développés pour induire
une résistance au *Grapevine fanleaf virus*, agent principal de la
maladie du court-noué**

Présenté par

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
Centre de Recherche de Colmar
Unité Mixte de Recherche Vigne et Vins d'Alsace
INRA-Université Louis Pasteur
28, rue de Herrlisheim
68021 Colmar

à la

COMMISSION DU GENIE BIOMOLECULAIRE
Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation
Direction Générale de l'Alimentation
Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement
Direction de la Prévention des Pollutions et des Risques
251, rue de Vaugirard
75732 Paris cedex 15

Dossier de demande d'avis pour une expérimentation hors confinement de plants de vigne transgéniques développés pour induire une résistance au *Grapevine fanleaf virus*

Sommaire	Page
A. Informations d'ordre général	
1. Nom et adresse du notifiant	3
2. Nom, qualification et expérience des scientifiques responsables	3
3. Titre du projet	3
B. Informations concernant les plantes réceptrices	
1. Nom complet, position systématique et évolution	3
2. Information concernant la reproduction de la vigne	
2.1. Le bouturage et le greffage	4
2.2. La reproduction sexuée	5
3. Capacité de survie de la vigne	6
4. Dissémination de la vigne	6
5. Distribution géographique de la vigne	6
6. La maladie du court-noué de la vigne	7
C. Informations concernant la modification génétique	
1. Description de la méthode de transformation utilisée	7
2. Nature et source du vecteur utilisé	7
3. Taille, origine et fonction de chaque fragment constituant la région envisagée pour le transfert	8
D. Informations concernant la plante supérieure génétiquement modifiée	
1. Description des traits et caractéristiques qui ont été introduits	8
2. Informations sur les séquences réellement transférées	9
3. Informations concernant l'expression de l'insert	9
4. Modifications éventuelles par rapport à une plante non OGM	10
5. Stabilité génétique de l'insert	10
6. Possibilités de transfert du matériel génétique à d'autres organismes	10
7. Toxicité ou effets nocifs de la modification génétique sur la santé publique et l'environnement	10
8. Mécanismes d'interaction entre la plante génétiquement modifiée et les organismes cibles	10
9. Interactions significatives avec les organismes non cibles	11
10. Description des méthodes de détection et d'identification de l'OGM	11
11. Historique des précédentes disséminations	12
E. Informations concernant le site de dissémination	
1. Localisation et étendue du site de dissémination	12
2. Description de l'écosystème du site de dissémination y compris le climat, la flore et la faune	13
F. Information concernant la dissémination	
1. Objectifs de la dissémination	14
2. Date et durée prévues de l'opération	15
3. Méthode de dissémination envisagée	15
4. Préparation et gestion du site, avant, pendant et après la dissémination, y compris les pratiques culturales et les méthodes de récolte	15
G. Mesures de prévention de dispersion	
1. Distance des autres espèces végétales sexuellement compatibles	17
2. Mesures pour minimiser ou empêcher la dissémination du pollen et des graines	17
3. Propositions de gestion de la parcelle après la récolte et pour le traitement de déchets	17
4. Description des plans et techniques de surveillance	18
5. Description des plans d'urgence	18
H. Incidence de la dissémination des plantes génétiquement modifiées sur l'environnement	
1. Dissémination de séquences fonctionnelles vers les bactéries du sol	18
2. Dissémination des transgènes par le pollen	19
3. Dissémination des transgènes par la graine	19
4. Dissémination de séquences fonctionnelles du virus	19
I. Références bibliographiques	19
J. Tableaux, figures et annexes	21-27

A. INFORMATIONS D'ORDRE GENERAL

1. Nom et adresse du notifiant

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)
Centre de Recherche de Colmar
Unité Mixte de Recherche Vigne et Vins d'Alsace
INRA-Université Louis Pasteur
28, rue de Herrlisheim
68021 Colmar

Téléphone : 03 89 22 49 00

Télécopie : 03 89 22 49 33

2. Nom, qualification et expérience des scientifiques responsables

Jean Masson, Président de Centre, Chargé de Recherche, INRA
Olivier Lemaire, animateur du Laboratoire de Virologie, Chargé de Recherche, INRA
Marc Fuchs, Chargé de Recherche, INRA

3. Titre du projet

Expérimentation en milieu non confiné de porte-greffes de vigne transgéniques exprimant le gène de la protéine de capsid du *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) et mise en place d'un dispositif de biovigilance

B. INFORMATIONS CONCERNANT LES PLANTES RECEPTRICES

1. Nom complet, position systématique et évolution

Le matériel végétal expérimental est la vigne (*Vitis* spp.) dont les plants sont constitués d'un greffon, qui fournit l'appareil aérien, implanté sur un porte-greffe, qui fournit l'appareil souterrain. Cinq événements indépendants de transformation du porte-greffe 41 B (*Vitis vinifera* x *Vitis berlandieri*) sont retenus pour la dissémination proposée dans le cadre de ce dossier de demande d'avis (Tableau 1).

La famille des Vitacées appartient à l'ordre des Rhamnales qui comprend neuf genres dont le genre *Vitis*. Celui-ci est séparé en 2 sous-genres : *Muscadinia* ($2n = 40$) et *Euvitis* ($2n = 38$). La quasi-totalité des vignes cultivées fait partie des *Euvitis* qui se divisent en 3 groupes : eurasiatique, asiatique et américain.

Le groupe de vigne eurasiatique ne comporte qu'une seule espèce : *Vitis vinifera* Linné et son archétype *Vitis vinifera sylvestris*. Avant l'intervention du mildiou et du phylloxera, cette vigne sauvage a pu se perpétuer sans entrave dans un grand nombre de sites forestiers européens et du bassin méditerranéen, aussi bien sous la forme originale dioïque que sous des formes hermaphrodites acquises à la suite de croisements spontanés, notamment avec des cépages cultivés à proximité plus ou moins immédiate. En Europe occidentale, cette vigne sauvage a pratiquement

été éliminée aussi bien sous l'effet du mildiou et du phylloxera que des réaménagements territoriaux et de la disparition des forêts primaires. Elle subsiste quelque peu, tout en étant en régression, dans l'est de l'Europe, l'Asie moyenne et certaines régions du bassin méditerranéen. La vigne cultivée proprement dite, *Vitis vinifera sativa*, comprend des milliers de variétés ou cépages.

Le groupe des vignes asiatiques comprend un peu plus de 10 espèces souvent peu étudiées, dont la plus commune est *Vitis amurensis*. Cette espèce est assez sensible au phylloxera, très résistante au mildiou et au froid hivernal. En raison de ses propriétés, notamment la résistance au froid, elle est utilisée comme géniteur dans des programmes d'amélioration génétique.

Le groupe des vignes américaines comprend une vingtaine d'espèces qui n'ont généralement pas de caractéristiques organoleptiques intéressantes parce que les baies ont un goût "foxé". Cependant, elles présentent des caractères de résistance à d'importants pathogènes (phylloxera, mildiou, oïdium). De ce fait, ces espèces ou des hybrides issus de croisements avec ces espèces constituent désormais les porte-greffes utilisés par la filière viticole parce qu'ils sont résistants au phylloxera. De plus, ces espèces sont utilisées comme géniteurs d'hybrides producteurs directs après croisements avec *Vitis vinifera*. Les espèces les plus importantes du point de vue de leur utilisation viticole sont les suivantes :

- *Vitis labrusca* : sensible au calcaire, sensible au black-rot, assez sensible au phylloxera, moyennement résistante au mildiou, et très résistante à l'oïdium.
- *Vitis riparia* : sensible au calcaire, très résistante au mildiou, à l'oïdium et au black-rot, facilement bouturable.
- *Vitis berlandieri* : résistante au calcaire et à la sécheresse, résistante au phylloxera et au mildiou.

La répartition des espèces de vigne est inégale sur les différents continents. Cette situation peut s'expliquer par leur histoire. En effet, des graines fossiles de vigne, datées du début du tertiaire, ont été trouvées au Groenland, en Angleterre, en Europe centrale, en France, au Japon et aux Etats-Unis d'Amérique. Au cours des glaciations du quaternaire, de vastes migrations de flore et de faune ont eu lieu vers le sud. En Amérique du Nord, l'orientation nord-sud des principales chaînes de montagne a facilité ces migrations. En Europe, par contre, les chaînes montagneuses, généralement orientées est-ouest, ont constitué des barrières qui ont été à l'origine d'un appauvrissement considérable de la flore, particulièrement des formes adaptées aux climats chauds dont font partie la plupart des vitacées américaines. Au cours du réchauffement qui est survenu, une recolonisation partielle des territoires septentrionaux à partir des zones de repli s'est établie. Enfin, la disparition de *V. vinifera* en Amérique est probablement imputable aux parasites d'origine américaine (mildiou, oïdium, phylloxera) qui ont été introduits sur le continent européen à la fin du XIX^{ème} siècle.

2. Information concernant la reproduction de la vigne

2.1. Le bouturage et le greffage

La vigne cultivée est multipliée de façon végétative depuis plus de 2500 ans. Chez *V. vinifera*, le bouturage est aisé, néanmoins, cette technique a posé des problèmes en Europe à partir de l'invasion pyloxérique, c'est-à-dire avec l'obligation du greffage sur des porte-greffes résistants au phylloxera.

La production de jeunes plants exige donc une double opération : le greffage qui dépend de la callogénèse et le bouturage qui dépend de la rhizogénèse. Avant que le greffage ne devienne une nécessité, une technique usuelle de propagation de la vigne était le marcottage ou provignage, c'est-à-dire le bouturage de rameaux qui sont détachés de la plante-mère après avoir produit des racines.

Le phylloxera (*Dactylsphaera vitfolii* Schimer) est un puceron dont certaines formes radicicoles mobiles s'attaquent aux racines de *V. vinifera*. Les racines des vignes américaines (*V. rupestris*, *V. riparia*, *V. berlandieri*, etc) sont indemnes de dégâts. Ce puceron, introduit accidentellement pour la première fois en Europe en 1854, a provoqué des dommages identifiés dès 1863. A la fin du siècle, tout le vignoble européen était en voie de destruction. Le développement de ce parasite se poursuit encore, notamment dans le vignoble californien. En effet, le phylloxera peut se développer sous tous les climats et dès que les sols contiennent au moins 3% d'argile. La première stratégie de lutte contre ce parasite a été l'hybridation de *V. vinifera* avec les vignes américaines. Cette technique n'a pas donné satisfaction parce que le vin était impropre à la consommation. De ce fait, le greffage de la vigne est devenu indispensable. Il a pour but de réunir par un système de greffe une variété greffon (*V. vinifera*) qui fournira les fruits, la tige et les feuilles et une variété porte-greffe (hybrides de variétés américaines en général) apte à être greffée, dont les racines sont résistantes au phylloxera et bien adaptées au sol. La variété greffon fournit l'appareil aérien et le porte-greffe fournit l'appareil souterrain. Avec le recul du temps, il est possible d'affirmer que le greffage ne modifie pas le goût des raisins du greffon.

2.2. La reproduction sexuée

La reproduction sexuée est mise à profit dans les programmes de sélection par hybridation inter- ou intra-spécifiques. Elle ne peut avoir lieu dans la nature sans l'intervention de l'homme.

Les fleurs de la vigne sont groupées en inflorescences et leur nombre varie d'une centaine à quelques milliers par inflorescence selon la variété et le milieu. La grande majorité des variétés à fruits possède des fleurs hermaphrodites. Quelques cépages sont cependant femelles et nécessitent la présence de variétés pollinisatrices dans leurs plantations. Les espèces américaines et certaines espèces asiatiques sont dioïques ; leurs variétés sont soit mâles, soit femelles. Il existe également des cas, cependant assez rares, de variétés présentant des fleurs à caractères intermédiaires entre hermaphrodites, d'une part, mâles ou femelles d'autre part.

2.2.1. La pollinisation

Dans le cas de variétés hermaphrodites, ce qui est le cas de la grande majorité des variétés à fruits, la voie de pollinisation privilégiée est l'autofécondation des ovules d'une fleur par le pollen de la même fleur. La pollinisation autogame découle de la façon dont le pollen est libéré. L'ouverture brusque des sacs polliniques provoque l'éjection du pollen sous forme de petits nuages et le stigmate de la fleur reçoit les grains de pollen provenant de ses propres anthères. Le stigmate est fonctionnel avant l'ouverture des anthères. Sa surface réceptrice est garnie de papilles imprégnées d'un suc qui, en conditions normales, imbibe dans un délai maximum de 12 heures les grains de pollen, leur permettant d'amorcer leur germination. La pollinisation à fleur fermée sous capuchon a été rapportée. Comme le pollen est aussi transporté par le vent après ouverture de la fleur, l'allogamie n'est cependant pas à exclure. Celle-ci est obligatoire pour les cépages femelles et notamment pour les raisins de table de ce type. A température ambiante, la durée de vie du pollen de la vigne est de 4 à 8 semaines (Huglin, 1986).

Les agents de dissémination du pollen sont théoriquement essentiellement le vent et les insectes, notamment les abeilles. Toutefois, la proportion de pollen de vigne représentée au mois de juin n'est que de 2% (Cour *et al.*, 1972) et la proportion de pollen de vigne dans la masse annuelle

des pollens déposés sur les sédiments n'est que de quelques pour mille (Planchais, 1973). Ces résultats montrent que le rôle du vent est faible et, de plus, ne semble s'exercer que sur de très courtes distances. De même, le rôle des insectes pollinisateurs semble être négligeable.

2.2.2. *La germination du pollen*

La germination du pollen dépend de la température, l'optimum se situant autour de 25-28°C, et de la présence de bore. Différents auteurs ont signalé le rôle pollénicide de bouillies cupriques qui peuvent toucher le stigmate après la chute du capuchon. La fertilisation de l'ovule se fait 2 à 3 jours après la pollinisation.

2.3. Compatibilité sexuelle avec d'autres espèces végétales sauvages ou cultivées

L'hybridation interspécifique entre espèces du sous-genre *Euvitis* est à la base de l'obtention de nombreuses variétés cultivées, notamment de porte-greffes. L'hybridation entre espèces des sous-genres *Euvitis* et *Muscadinia* est également possible, quoique plus difficile du fait de la différence du nombre de chromosomes.

Aucune compatibilité avec des espèces sauvages ou cultivées autre que la vigne n'est connue.

3. Capacité de survie de la vigne

Les vignes productrices de raisin sont cultivées pendant 15 à 40 ans en général. Après arrachage d'une vigne, des débris de bois peuvent survivre et donner naissance à des plants. En particulier, des pieds de porte-greffes incomplètement arrachés peuvent donner naissance à des rejets. Dans le cas de l'arrachage de parcelles atteintes par le court-noué, une maladie dont l'agent principal responsable est le *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) qui est transmis de ceps à ceps par le nématode *Xiphinema index*, les plants de vigne sont d'abord dévitalisés (application d'un herbicide systémique) afin de détruire les racines et ainsi réduire la survie des nématodes virulifères sur les racines restant dans le sol, puis arrachés le printemps suivant le traitement.

4. Dissémination de la vigne

La dissémination de la vigne peut se faire sous 3 formes : bouture, graine et pollen. Des boutures peuvent être disséminées essentiellement par l'homme lors de la taille ou de l'arrachage d'une vigne. Le transport de bois de vigne par l'eau, suivi d'un développement de plants, a pu être décrit de manière anecdotique.

Les graines peuvent être disséminées par les consommateurs de raisins (homme, oiseaux, petits rongeurs, etc).

La dissémination du pollen se fait dans les conditions décrites précédemment au paragraphe n° B.2.2.1.

5. Distribution géographique de la vigne

A l'état naturel, les vignes du genre *Vitis* sont cantonnées dans l'hémisphère nord, dans une zone qui s'étend sur l'ensemble des continents jusqu'au 50ème parallèle et qui atteint l'Equateur en Amérique du Sud. C'est l'homme qui a transféré la vigne cultivée dans l'hémisphère sud dans les zones dont le climat permet sa culture.

L'altitude est un facteur limitant la culture de la vigne. On estime qu'une élévation de 30 m se traduit par un retard du cycle végétatif d'un jour. Ceci est bien sûr variable selon la latitude. Au milieu du XIX^{ème} siècle, on rapportait la présence de milliers de vignes sauvages dans les forêts le long du Rhin. Un siècle plus tard, seuls quelques rares exemplaires survivants ont pu être étudiés à cause de la suppression d'une grande partie des forêts suite à la régulation du cours du fleuve. Ce cas n'est pas isolé et la disparition des espèces sauvages de *Vitis* se poursuit dans le monde.

6. La maladie du court-noué de la vigne

La vigne est l'une des espèces ligneuses qui peut héberger le plus grand nombre de virus ; une cinquantaine de virus différents ont pu y être recensés, induisant des maladies aux effets très variables. Le court-noué est l'une des maladies virales les plus dommageables sur vigne, et est provoquée par un ensemble de virus appartenant au genre *Nepovirus*. Une douzaine de *Nepovirus*, transmis de façon exclusive par nématodes vecteurs, sont impliqués dans la maladie, qui affecte aussi bien les porte-greffes que les cépages. Les symptômes très variables se manifestent sur les différents organes de la vigne, affectant son rendement et sa longévité, empêchant à terme toute production de raisin. Le *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) est l'agent principal de la maladie du court-noué dans le vignoble français. Le GFLV est un virus isométrique de 28 nm de diamètre, constitué de 2 molécules d'ARN génomique (Figure 1a) de 7,3 (ARN1) et 3,8 kb (ARN2), souvent associées à un ARN satellite de 1,1 kb (ARN3). La lutte repose actuellement sur des pratiques culturales (devitalisation, arrachage) et le contrôle des populations de vecteurs notamment par traitements nématicides de sol.

C. INFORMATIONS CONCERNANT LA MODIFICATION GENETIQUE

1. Description de la méthode de transformation utilisée

Des cellules embryogènes du porte-greffe 41 B ont été obtenues à partir d'anthères (Mauro *et al.*, 1995). Ces cellules ont été transformées par co-culture avec *Agrobacterium tumefaciens* contenant le plasmide pRCPI. Ce plasmide, initialement cloné dans *Escherichia coli* souche HB101, a été mobilisé dans *A. tumefaciens* souche LBA4404 par conjugaison tri-parentale. Les embryons somatiques régénérés à partir des cellules transformées ont été sélectionnés sur milieu sélectif contenant de la kanamycine. Des plantules ont été régénérées à partir de ces embryons puis multipliées *in vitro*.

2. Nature et source du vecteur utilisé

La construction utilisée pour la transformation du porte-greffe 41 B, appelée pRCPI (Figure 1b), est basée sur le plasmide pROKI (Baulcombe *et al.*, 1986), un dérivé du plasmide pBIN19 (Bevan *et al.*, 1984). Elle contient dans la région du T-DNA le gène NPT II (néomycine phosphotransférase II, n° accession : U09365) qui confère une résistance à la kanamycine. L'expression de ce gène est contrôlée par le promoteur (pnos, n° accession : M17251) et le terminateur (tnos, n° accession : V00087) nos (nopaline synthase) ; il est donc exprimable dans les plantes transformées. Hors T-DNA, le plasmide pRCPI contient un gène conférant une résistance à la kanamycine exprimable seulement dans les bactéries. Le gène CP est exprimé sous le promoteur 35S (n° accession : X69707) du virus de la mosaïque du chou-fleur et le terminateur nos (Serghini *et al.*, 1991).

3. Taille, origine et fonction de chaque fragment constituant la région envisagée pour le transfert

Le gène de la protéine de capsid (CP, n° accession : NP733996) de la souche F13 du GFLV a tout d'abord été cloné sous forme ADNc dans le vecteur d'expression pCPM (Serghini *et al.*, 1991). Il a ensuite été excisé du plasmide pCPM par digestion avec les enzymes de restriction Hinc II et Hind III, le site Hind III ayant été rempli avec l'ADN polymérase de Klenow afin de procéder à une ligation en bouts francs, puis inséré dans le plasmide pROKI au site BamH I entre le promoteur 35S et le terminateur nos, donnant le plasmide pRCPI (Bardonnnet *et al.*, 1994; Serghini *et al.*, 1991).

La CP étant obtenue par maturation de la polyprotéine codée par l'ARN2 du GFLV par clivage protéolytique (Serghini *et al.*, 1990), un codon AUG d'initiation de traduction et une séquence leader de 17 nucléotides dérivée de l'ARN3 (ARN satellite) de la souche F13 du GFLV (Pinck *et al.*, 1988) ont été introduits par mutagénèse dirigée en amont des 1515 nucléotides codant la CP pour assurer une expression indépendante du gène CP (Serghini *et al.*, 1991). La séquence leader a pour but d'augmenter l'efficacité de la traduction de la protéine. En aval du gène codant la CP, la séquence correspondant à l'extrémité 3' de l'ARN2 du GFLV (212 nucléotides) (Serghini *et al.*, 1990) ainsi qu'une séquence poly-A (33 nucléotides) ont également été insérées (Serghini *et al.*, 1991). Ces deux séquences ont pour fonction d'augmenter la stabilité des ARNs messagers issus du transgène.

Les séquences d'origine virale sont entièrement connues (Serghini *et al.*, 1990; 1991). Le gène codant la CP introduit dans le plasmide pROKI comprend au total 1,78 kb et se situe près de la bordure gauche du T-DNA (LB). Le T-DNA du plasmide pRCPI a une taille d'environ 5,5 kb et comprend les gènes CP et NPT II (Figure 1b).

D. INFORMATIONS CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE

1. Description des traits et caractéristiques qui ont été introduits

Le phénotype que l'on cherche à induire dans le porte-greffe de vigne transgénique est une protection vis-à-vis du *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) par la transcription et/ou l'expression du gène de la protéine de capsid de ce virus.

Des essais préliminaires destinés à éprouver le niveau de résistance du matériel transgénique ont été réalisés en milieu non confiné de 1996 à 1999 (dossier CGB n° B/FR/96.03.11). Ces essais ont permis d'identifier trois événements de transformation résistants à l'infection naturelle par le GFLV (Vigne *et al.*, 2004).

Pour les essais faisant l'objet de la présente demande d'avis, nous avons retenu 5 transformants du porte-greffe 41 B de vigne : 68, 77, 206, 219 et 240 (Tableau 1). Ces 5 transformants ont déjà fait l'objet de trois dossiers de demande d'avis soumis à la Commission du Génie Biomoléculaire (dossiers n° B/FR/94.11.04, n° B/FR/96.03.11 et n° B/FR/99.03.10). Ces trois dossiers ont reçu un avis favorable et ont bénéficié d'une autorisation d'expérimentation des ministères compétents.

2. Informations sur les séquences réellement transférées

L'ADN transféré se limite au fragment situé entre les bordures droite (RB) et gauche (LB) du vecteur (Figure 1b). La présence du gène CP dans l'ADN génomique des transformants et le nombre de copies transférées ont été vérifiées par Southern blot (Figure 2) en utilisant comme sonde soit le fragment Sal I-EcoR I correspondant à un fragment du gène codant la CP du GFLV (coordonnées 6,4 et 7,48 de pRCPI), soit un fragment Sph I correspondant à la bordure droite du T-DNA (coordonnées 10,2 et 11,2 de pRCPI) (Figure 1b).

Le nombre d'insertions du T-DNA dans le génome nucléaire de la vigne, estimé sur la base d'une digestion de l'ADN génomique par Hind III, est de 1 ou 2 (Tableau 1 et Figure 2).

La présence de séquences du vecteur qui auraient pu être introduites par intégration dépassant la bordure gauche du T-DNA a été recherchée par PCR en utilisant comme amorces une paire d'oligonucléotides situés de part et d'autre de la bordure gauche, dans le promoteur 35S et à 80 nucléotides au-delà des séquences répétées de la bordure gauche du T-DNA (Yadav *et al.*, 1982). Ces amorces amplifient un fragment d'environ 1 kb. Aucun des 5 transformants retenus pour l'expérimentation proposée dans ce dossier de demande d'avis n'a répondu positivement à ce test (Tableau 1).

3. Informations concernant l'expression de l'insert

Les vitroplants des 5 transformants sélectionnés dans ce dossier de demande d'avis expriment les gènes NPT II et CP. L'accumulation des mRNAs du gène codant la CP du GFLV a été vérifiée par Northern blot avec une sonde correspondant à la CP marquée au Dig-dUTP dans les 5 événements de transformation retenus pour la dissémination (Tableau 1 et Figure 3).

L'activité du gène NPT II a également été vérifiée selon les techniques décrites par McDonnell *et al.* (1987) et Peng *et al.* (1993) puis par analyse sérologique de type enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Fuchs et Gonsalves, 1995) dans les vitroplants. La protéine CP du GFLV a été détectée en ELISA avec des anticorps spécifiques dans les vitroplants (Walter et Etienne, 1987) (Tableau 1).

L'expression du gène NPT II a également été mise en évidence en ELISA dans les feuilles des plantes transgéniques sevrées en serre S2 ou expérimentées sur le terrain (dossier CGB n° B/FR/94.11.04). Quant au gène CP, son expression n'a pas été détectée en ELISA dans les plantes sevrées en serre S2 ou expérimentées sur le terrain. De ce fait, son niveau d'expression en-deça du niveau de sensibilité du test sérologique utilisé, est très faible.

4. Modifications éventuelles par rapport à une plante non OGM

Des analyses morphologiques comparatives entre porte-greffes transgéniques et non-transgéniques ont été effectuées pour vérifier la conformité variétale du matériel génétiquement modifié. Aucune différence apparente n'a été observée ni au stade juvénile ni après 5 ans de culture en milieu non confiné (dossier CGB n° B/FR/94.11.04).

5. Stabilité génétique de l'insert

La vigne étant multipliée par voie végétative, la présence des gènes NPT II et CP du GFLV a été vérifiée par Southern blot ou PCR dans des boutures des plantules régénérées. Ces gènes sont toujours détectés après 5 ans de culture en milieu non confiné (dossier CGB n° B/FR/94.11.04). Ces résultats illustrent la stabilité génétique des transgènes.

6. Possibilités de transfert du matériel génétique à d'autres organismes

Le transfert du matériel génétique des porte-greffes de vigne transgéniques à d'autres plantes par pollinisation est peu probable parce que la seule espèce compatible est la vigne qui est, par ailleurs, fortement autogame. Par ailleurs, les plants disséminés seront des plants greffés-soudés constitués d'un porte-greffe transgénique qui ne fleurit pas et d'un greffon non-transformé.

Il est théoriquement possible que tout ou partie du transgène d'origine viral puisse se réassortir avec un virus infectant la vigne, notamment par recombinaison ARN-ARN entre les ARNm du transgène et les ARN viraux d'un isolat challenger, par exemple un isolat de GFLV. Ce phénomène est amplement décrit lorsque des plantes herbacées (tabacs) sont inoculées avec des virus défectifs en condition de laboratoire. Cependant, ce phénomène n'a pas été observé jusqu'à présent en milieu non confiné, notamment avec les plants de vigne transgéniques proposés pour l'expérimentation envisagée (Vigne *et al.*, 2004).

7. Toxicité ou effets nocifs de la modification génétique sur la santé publique et l'environnement

Aucun effet nocif n'est connu pour la protéine codée par le gène CP du GFLV ni pour la protéine codée par le gène NPT II (Fuchs *et al.*, 1993; Nap *et al.*, 1992). Il faut également garder à l'esprit que les baies de raisins des plants de vigne naturellement infectés par le GFLV au vignoble contiennent des protéines virales dont la CP (Marc Fuchs, observation personnelle) et sont consommées.

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

Une protection vis-à-vis du GFLV, inoculé mécaniquement sous forme de particules virales purifiées ou d'ARN viraux, a été décrite chez un hôte modèle herbacé génétiquement transformé avec la CP du GFLV, *Nicotiana benthamiana*, sous la forme d'un retard à l'infection (Bardonnnet *et al.*, 1994). Pourquoi citer ces travaux sur l'ArMV alors que le dossier cible exclusivement le GFLV ?

La protection des plantes transgéniques exprimant le gène CP de virus vis-à-vis d'infections virales, y compris par le GFLV, est vraisemblablement expliquée par le phénomène d'extinction post-transcriptionnelle des (trans)gènes ou PTGS (post-transcriptional gene silencing). Ce phénomène s'appelle également RNA silencing ou extinction de l'expression des (trans)gènes. Il fait appel à la formation d'ARNs double brin (db), formés à partir du transgène d'origine viral ou de l'ARN (formes répliquatives) d'un isolat de GFLV infectant les plantes transgéniques, qui sont clivés par une ribonucléase de type III, appelée Dicer, en fragments double brin de 21-25 nt avec 2-3

nucléotides cohésifs. Ces petits fragments d'ARN db appelés siRNA (small interfering) s'associent à un complexe de nucléases appelé Risc (RNA-induced silencing complex) qui s'hybride à des ARNm simple brin complémentaires présentant de fortes homologies de séquence nucléotidique (transcrits du transgène et ARN d'un isolat de GFLV infectant). Le complexe Risc clive alors les ARNm à l'opposé des siRNA complémentaires, ce qui les soumet à différentes voies de dégradation. Ce phénomène de régulation de l'expression des (trans)gènes semble contrôler l'infection virale et la dissémination des transposons. Les ARNs viraux peuvent induire mais également subir le mécanisme de RNA silencing comme s'il existait un équilibre subtil permanent entre réplication virale et infection d'une plante d'une part, et induction et systémie du signal des mécanismes antiviraux d'autre part. Une conséquence de la régulation de cet équilibre est l'établissement ou non de l'infection virale dans le cas respectivement de plantes sensibles ou résistantes. Il faut également noter que certains virus de plantes expriment des protéines qui agissent comme suppresseurs du phénomène d'extinction de l'expression des (trans)gènes en interagissant avec plusieurs étapes de ce phénomène de régulation.

La protection des plantes transgéniques exprimant le gène CP de virus vis-à-vis d'infections virales, y compris par le GFLV, peut également s'expliquer par l'intervention de la protéine de capsid qui pourrait interférer avec un composant de la plante ou directement avec l'ARN d'un isolat de GFLV challenger en inhibant sa réplication, sa traduction ou l'assemblage des sous-unités protéiques en particules virales.

9. Interactions significatives avec les organismes non cibles

Aucune interaction significative entre porte-greffes de vigne et organismes non cibles n'est connue. De ce fait, aucune interaction significative n'est envisagée entre porte-greffes transgéniques et organismes non cibles.

10. Description des méthodes de détection et d'identification de l'OGM

Les plants de vigne transgéniques peuvent être identifiés en procédant à une PCR sur l'ADN génomique avec des amorces spécifiques des gènes CP du GFLV et/ou NPT II et par détection de l'expression du gène NPT II en ELISA. Si nécessaire, la détermination de la séquence des transgènes peut être envisagée pour identifier de façon définitive les vignes transgéniques.

11. Historique des précédentes disséminations

Trois dossiers de demande d'avis ont été déposés auprès de la CGB en 1994 (B/FR/94.11.04), 1996 (B/FR/96.03.14) et 1999 (B/FR/99.03.10). Ces trois dossiers ont bénéficié d'un avis favorable et d'une autorisation de dissémination en milieu non confiné délivrée par les ministères compétents. Les objectifs des expérimentations proposées dans ces dossier étaient :

- Vérifier la conformité de porte-greffes transgéniques dans un sol non infecté (B/FR/94.11.04). Deux parcelles, chacune avec 540 plants greffés, et une autre parcelle avec 815 plants non-greffés ont été établies au vignoble. Ces expérimentations ont été interrompues en juillet 1999 et les plants ont été incinérés sur les sites.

- Eprouver le niveau de protection de porte-greffes transgéniques vis-à-vis de l'infection naturelle par le GFLV (B/FR/96.03.14). Deux parcelles de 250 plants ont été mises en place au vignoble dans une zone infectée par le GFLV. Cette expérimentation a été interrompue en juillet 1999 et les plants détruits et incinérés sur les sites expérimentaux.
- Evaluer les risques environnementaux d'encapsidation hétérologue et de recombinaison liés aux porte-greffes transgéniques (B/FR/99.03.10). Ce dossier a été retiré pour permettre la mise en oeuvre d'une expérience pilote de co-construction d'un programme de recherche (<http://www.inra.fr/internet/Directions/SED/science-gouvernance/ITA-Vignes/index.html>) et les plants de vigne préparés pour la dissémination n'ont jamais été implantés au vignoble.

E. INFORMATIONS CONCERNANT LE SITE DE DISSEMINATION

1. Localisation et étendue du site de dissémination

La dissémination est envisagée sur le Domaine Expérimental du Centre de Recherche INRA de Colmar, sur la commune de Colmar (68) en Alsace au lieu dit Eguisheimer Huben (Zweiter Zug), section SZ, numéro de parcelle 158. Le Domaine Expérimental Agricole et Viticole du Centre de Recherche INRA de Colmar se situe en plaine dans une zone péri-urbaine au sud-ouest de la ville de Colmar (Annexe n° 1). Le site expérimental est isolé des autres parcelles implantées avec de la vigne sur le Domaine Expérimental de l'INRA (Annexe n° 2). La surface totale du site est de 21 ares 27.

La surface envisagée pour la dissémination est de 10 ares dont 0,35 implantés avec des plants de vigne transgéniques (Annexe n° 3). La parcelle comprendra au total 1604 plants dont 70 transgéniques et 1534 non-transgéniques (Annexe n° 3).

Le dispositif expérimental prévu comprend 5 zones distinctes (Annexe n° 3) :

- 1) La zone centrale sera contaminée avec des nématodes virulifères. Environ 40 m³ de sol contenant ces nématodes seront transférés d'une parcelle naturellement contaminée du vignoble alsacien après avoir éliminé un volume équivalent dans la parcelle. La zone centrale hébergera des plants transgéniques (50 individus) et des témoins non-transgéniques (10 individus) qui seront analysés pour leur niveau de protection vis-à-vis de l'infection naturelle par le GFLV. Ces plants destinés à l'évaluation de la résistance seront entourés d'un rang de bordure constitué de plants non-transgéniques (36 individus) qui serviront à mesurer le taux de transmission du GFLV par les nématodes *Xiphinema index*. La surface de la zone centrale sera de 0,40 ares.
- 2) Un conservatoire de plants transgéniques sera installé à proximité de la zone centrale. Ce conservatoire sera constitué de plants transgéniques (20 individus) et non-transgéniques (4 individus). La surface du conservatoire sera de 0,05 ares.
- 3) La zone centrale et le conservatoire seront entourés d'une zone de confinement exclusivement constituée de plants non-transgéniques (336 individus). Elle a pour fonction de mettre en évidence un transfert horizontal des nématodes qui quitteraient éventuellement la zone contaminée. La surface de la zone de confinement sera de 1,70 ares.

- 4) La zone de confinement sera entourée d'une zone de sécurité (jachère) pour faire physiquement barrière aux nématodes qui migreraient éventuellement hors de la zone centrale. Sachant que *Xiphinema index* ne se développe efficacement que sur la vigne et le figuier, une absence de culture devrait stopper toute migration éventuelle du nématode. De plus, aucune étude atteste d'une mobilité verticale de *Xiphinema index* indépendante de la prospection racinaire. La surface de la zone de sécurité sera de 2,25 ares.
- 5) La zone de sécurité sera entourée d'une zone de bordure constituée exclusivement de plants non-transgéniques (1148 individus). La surface de la zone de bordure sera de 5,60 ares.

2. Description de l'écosystème du site de dissémination y compris le climat, la flore et la faune

La commune de Colmar se situe dans le Département du Haut-Rhin (68). Les sols du Domaine Expérimental Agricole et Viticole de l'INRA sont de type limon loessique. Ces limons constituent un type de sol brun à éléments fins calcaires qui se distinguent par un spectre de granulométrie typique de sédiments éoliens. Une analyse physique met en évidence l'importance de la fraction granulométrique inférieure à 50 mm ; elle indique d'autre part un taux d'argile et de limon légèrement supérieur en surface, qu'accompagne jusqu'à moins 70 cm une décarbonatation partielle (Annexe 4). En profondeur par contre, on constate une accumulation de carbonate de calcium et un accroissement de la teneur en sables grossiers à la base du profil. Une analyse chimique indique des besoins modérés en acide phosphorique assimilable et une légère déficience en potasse échangeable. Le niveau calcique et le pH de ces sols sont élevés (pH 8) et leur teneur en matière organique totale avoisine 2%. Les sols sont bien aérés; l'activité zoogène est importante et leur capacité de rétention d'eau est relativement élevée. Cependant, le ressuyage de ces limons est plutôt lent.

Le climat de la région de Colmar est de type semi-continentale qui se caractérise par une pluviosité hivernale et printanière faibles et des variations de température journalière et saisonnière à forte amplitude. Avec une pluviométrie totale annuelle de 530 mm, Colmar se situe dans un noyau de sécheresse imputable à l'importance de la barrière que constitue le massif vosgien à proximité. L'été est chaud et l'hiver sec et froid. La température moyenne annuelle est de 10,7 °C. On compte également en moyenne 60 jours de gelée par an. Les gelées tardives de printemps sont à redouter car elles sont en mesure de causer d'importants dégâts à la vigne. Les vents du nord, nord-nord est, sud et sud ouest dominant. Les vents du sud sont prépondérants en hiver et ceux du nord pendant les autres saisons.

Il faut noter la présence de lièvres, corbeaux, merles, pies, pigeons, et étourneaux sur le Domaine Expérimental Agricole et Viticole de l'INRA de Colmar.

Les principales adventices rencontrées sur le Domaine sont le mouron des oiseaux, l'amaranthe, le chénopode et la mercuriale.

F. INFORMATION CONCERNANT LA DISSEMINATION

1. Objectif de la dissémination

Notre demande d'avis porte sur l'expérimentation en milieu non confiné de porte-greffes de vigne transgéniques exprimant le gène de la protéine de capsid du GFLV et la mise en place d'un dispositif de biovigilance. Les objectifs de la dissémination proposée sont :

- Confirmer nos données préliminaires sur le niveau de protection des 5 lignées de porte-greffe transgénique (68, 77, 206, 219 et 240) vis-à-vis de l'infection naturelle du GFLV via les nématodes vecteurs
- Evaluer l'effet des porte-greffes transgéniques sur la dynamique et la variabilité génétique des populations de GFLV transmises par les nématodes virulifères
- Suivre la mobilité des nématodes vecteurs du GFLV
- Analyser le transfert éventuel des produits des transgènes (protéines, mRNAs, siRNAs) des porte-greffes transgéniques vers le greffon non-transgénique

Notre demande d'avis s'inscrit dans une démarche globale de l'INRA, en particulier de sa Direction Générale, suite à la mise en oeuvre d'une expérience pilote de co-construction d'un programme de recherche, dont l'objectif principal a été d'organiser sur des bases nouvelles, participatives et transparentes un débat sur les orientations de la recherche sur les porte-greffes de vigne transgéniques potentiellement résistants au GFLV (<http://www.inra.fr/internet/Directions/SED/science-gouvernance/ITA-Vignes/index.html>). Un groupe de travail constitué de 14 personnes (4 chercheurs, 6 professionnels de la vigne et du vin et 4 citoyens) aux sensibilités et visions du monde variées a été sélectionné pour cette expérience pilote. Ce groupe a débattu, entre autre, de l'opportunité de réaliser des essais en milieu non confiné et a rédigé un rapport contenant des recommandations et des points de vigilance à l'attention de la Direction Générale de l'INRA, commanditaire de l'opération. Sur la base de cet éclairage, la Direction Générale de l'INRA a décidé de solliciter l'autorisation de poursuivre l'expérimentation de porte-greffes de vigne transgéniques en plein champ, tout en respectant les valeurs et les principes fondamentaux du contexte économique et social et l'image et la symbolique de la vigne, et en associant un comité local de suivi de l'expérimentation (<http://www.inra.fr/internet/Directions/SED/science-gouvernance/ITA-Vignes/index.html>). Ce comité est constitué de 15 personnes (2 représentants de la filière vitivinicole, 2 viticulteurs, 2 représentants de syndicats d'agriculteurs/viticulteurs, 2 représentants d'associations de protection de l'environnement et des consommateurs, 2 représentants de l'administration de la Région Alsace, 1 élu local, 1 chercheur, 2 riverains et le Président du Centre INRA de Colmar).

2. Date et durée prévue de l'opération

La mise en place de l'essai est envisagée en mai 2004. Nous souhaitons suivre les plants de vigne du dispositif expérimental jusqu'à l'automne 2008, soit une durée de 4 ans.

3. Méthode de dissémination envisagée

Les plants de porte-greffes de vigne transgéniques seront multipliés par bouturage en culture *in vitro* puis en serre à l'INRA de Colmar. Les plants greffés-soudés (greffon non-transgénique sur porte-greffes transgéniques) seront produits par greffe bouture herbacée en serre à l'INRA de Colmar.

Les plants témoins (greffon non-transgénique sur porte-greffe non-transgénique) seront multipliés par bouturage en serre à l'INRA de Colmar puis assemblés par greffe bouture herbacée.

Pour éprouver le niveau de protection vis-à-vis de l'infection par le GFLV, 10 plants de chaque lignée transgénique seront installés sur le site de la dissémination en 4 blocs entièrement randomisés.

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

Les plants de vigne seront installés manuellement sur le site expérimental après confection de trous à l'aide de bêches et de pioches. La parcelle comprendra 37 rangs et, soit 20, soit 44, soit 54 plants par rang. La distance prévue sur le rang est de 0,5 m et entre les rangs elle sera de 1,0 m. Un arrosage manuel des plants est prévu après la plantation ainsi que la pose de filets protecteurs à la base des plants pour prévenir d'éventuels dégâts causés par des lièvres ou d'autres rongeurs.

L'appareil végétatif aérien sera protégé du mildiou et de l'oïdium par une couverture phytosanitaire conventionnelle dont le détail est donné en Annexe n° 5. Cette protection sera appliquée chaque année.

La lutte contre les adventices se fera conformément aux usages en appliquant des herbicides de pré-levée (1 000 g/ha d'isoxaben puis 2 500 g/ha en application fractionnée de diuron en alternance avec 6 075 g/ha de dichlobénil et 1 000 g/ha d'isoxaben) et de post-levée (aminotriazole 2 800 g/ha si nécessaire au printemps et glufosinate-ammonium 600 g/ha si nécessaire en été) suivant l'apparition de plantules ou de repousses en cours de saison.

Le matériel expérimental sera constitué de Chardonnay (greffon non-transgénique) clone 96 ou de Cabernet Sauvignon (greffon non-transgénique) clone 15, qui appartiennent au domaine public (<http://www.onivins.fr>), greffé sur le porte-greffe 41 B, soit transgénique soit non-transgénique (clone 194, 232 ou 233), qui appartient également au domaine public (<http://www.onivins.fr>). Des précautions seront prises pour éliminer manuellement les éventuels rejets qui peuvent se développer sur les porte-greffes transgéniques. Le contrôle et la suppression de rejets feront l'objet de passages spécifiques et réguliers chaque année. Ces rejets seront détruits par incinération à proximité du site ou stérilisation dans les laboratoires ou serres du Centre de Recherche INRA de Colmar.

La taille hivernale pratiquée en janvier/février porte sur les bois issus du greffon non-transgénique. La taille sera réalisée manuellement à l'aide de sécateurs selon le mode de conduite traditionnel en Alsace (taille Guyot double). Nos études préliminaires de mise en évidence de la présence des produits des transgènes, CP et NPT II en ELISA, ne nous ont pas permis de mettre en évidence un quelconque transfert de ces protéines des porte-greffes transgéniques vers le greffon non-transgénique (B/RF/94.11.04 et B/FR/96.03.14). Toutefois, les bois éliminés provenant des greffons non-transgéniques seront éliminés par incinération à proximité du site de dissémination. Les sarments qui sont laissés sur le plant à la taille seront ensuite liés aux fils de palissage avec de la ficelle. Cette opération de liage a lieu en mars. Le débourrement se déroule en avril à partir des bourgeons laissés à la taille. Une sélection des plus belles pousses sera réalisée à la mi-mai ; c'est l'opération d'ébourgeonnage. Les pousses de greffon non-transgénique qui seront supprimées manuellement seront éliminées par incinération à proximité du site de dissémination.

Les greffons produiront des inflorescences durant la 3ème (2007) voire la 4ème année (2008) après la plantation, soit quasiment au terme de la dissémination. Ces inflorescences seront systématiquement éliminées manuellement sur tous les plants de vigne, transgéniques ou non-transgéniques, avant la floraison. De ce fait, aucun fruit ne se développera sur les plants de vigne de la parcelle.

Le pallissage consiste à positionner, fin juin-début juillet, les pousses du greffon dans un plan vertical matérialisé par des fils de fer. En juillet et août, nous procéderons à l'opération de rognage qui consiste à couper les pousses dépassant du plan de palissage afin d'optimiser l'interception du rayonnement solaire. Les tiges et les feuilles supprimées sont issues du greffon non-transgénique. Elles seront éliminées par incinération à proximité du site de dissémination. En automne, les feuilles de greffons tombent ; elles resteront sur le sol et se décomposeront naturellement.

Des prélèvements d'échantillons issus du végétal (feuilles, sarments, tiges, bois, racines) et des prélèvements de sol seront réalisés durant l'essai. Ceux-ci sont destinés à des expérimentations en condition de laboratoire au Centre de Recherche INRA de Colmar. Ces prélèvements sont destinés à apporter des éléments de réponses aux objectifs décrits au paragraphe n° F.1. (pages 13 et 14).

G. MESURES DE PREVENTION DE DISPERSION

1. Distance des autres espèces végétales sexuellement compatibles

Les plants de vigne retenus pour l'expérimentation sont constitués d'un greffon non-transgénique greffé sur des porte-greffes transgéniques ou non-transgéniques. Les plants seront installés dans une parcelle isolée du Domaine Expérimental Agricole et Viticole du Centre de Recherche de l'INRA à Colmar.

D'autres parcelles expérimentales, exclusivement constituées de plants de vigne non-transgéniques, sont présentes sur le Domaine de l'INRA, la plus proche du site de dissémination proposé est distante de 50 m avec un bâtiment séparant les 2 parcelles.

Le vignoble commercial d'Appellation d'Origine Contrôlée le plus proche est situé à environ 1 km du site de dissémination retenu sur le Domaine de l'INRA de Colmar.

2. Mesures pour minimiser ou empêcher la dissémination du pollen et des graines

Les porte-greffes de vigne transgéniques sont greffés et ne produiront pas d'inflorescences. Les rejets, qui éventuellement se développeront sur les porte-greffes transgéniques, feront l'objet de plusieurs passages annuels pour les éliminer et les incinérer ou les stériliser. De ce fait, la dissémination des transgènes via le pollen et les graines est quasiment improbable.

Il faut également savoir que la variété de porte-greffe retenue pour la dissémination est le 41 B, une variété femelle. Par conséquent, la formation de pollen transgénique est impossible.

3. Propositions de gestion de la parcelle après la récolte et pour le traitements de déchets

A l'issue de l'essai (automne 2008), l'ensemble du matériel végétal sera détruit. Les plants seront dévitalisés avec du glyphosate puis arrachés au printemps suivant et brûlés. Le sol sera désinfecté avec du dichloropropène (555 kg/ha de matière active) afin de détruire les nématodes.

Les rejets éventuels des porte-greffes transgéniques seront prélevés manuellement puis incinérés à proximité du site de dissémination. De plus, aucune vigne ne sera implantée sur le site de dissémination pendant une période de 10 après l'interruption de la dissémination.

4. Description des plans et techniques de surveillance

Le dispositif expérimental comprend une zone centrale contaminée, une zone de confinement, une zone de sécurité et une zone de bordure (Annexe 3).

Le protocole de l'essai et les conditions d'expérimentation, notamment les précautions, ont été discutés et évalués en toute transparence avec un comité local de suivi de l'essai. Ce comité est constitué de 15 personnes (2 représentants de la filière vitivinicole, 2 viticulteurs, 2 représentants de syndicats d'agriculteurs/viticulteurs, 2 représentants d'associations de protection de l'environnement et des consommateurs, 2 représentants de l'administration de la Région Alsace, 1 élu local, 1 chercheur, 2 riverains et le Président du Centre INRA de Colmar).

La transmission mécanique du GFLV par contact ou par l'intermédiaire des outils ou engins agricoles n'est pas connue. Seuls les nématodes vecteurs *Xiphinema index* peuvent disperser le virus. Ces nématodes sont très peu mobiles (moins de 30 cm/an) et se situent essentiellement au niveau des racines, en particulier les radicules en croissance. D'autre part, la parcelle étant plane, il est improbable que les nématodes puissent être entraînés par les eaux de ruissellement. Les nématodes ne se trouvent pas en surface, ils ne peuvent donc pas être transportés hors de l'essai par les machines agricoles ou les bottes des opérateurs. De plus, la mobilité verticale des nématodes n'est pas connue en dehors d'un contexte de prospection racinaire. Toutefois, des prélèvements de terre et l'isolement des nématodes seront réalisés dans la parcelle afin d'estimer la dynamique de la population de nématodes. Ce suivi nématologique sera réalisé au Centre de Recherche de l'INRA de Colmar.

La présence du GFLV sera détectée en suivant le développement de symptômes typiques de la maladie du court-noué (mosaïque foliaire, chlorose foliaire, rabougrissement, etc...) et par analyses sérologiques de type ELISA ou moléculaires de type RT-PCR ou IC-RT-PCR conventionnelle et quantitative. Notre recherche sera orientée vers un isolement et une caractérisation de souches virales présentant une virulence inhabituelle. Ces travaux seront effectués au Centre de Recherche de l'INRA de Colmar.

5. Description des plans d'urgence

Le personnel du laboratoire de Virologie de l'UMR Vigne et Vins d'Alsace et du Domaine Expérimental du Centre de Recherche INRA de Colmar qui travaille sur le site de dissémination sera informé de la nature de l'essai, des précautions d'usage et du cahier des charges à respecter.

En cas d'émergence de phénomènes non-intentionnels imprévus, la parcelle serait immédiatement arrachée.

H. INCIDENCE DE LA DISSEMINATION DES PLANTES GENETIQUEMENT MODIFIEES SUR L'ENVIRONNEMENT

En principe, 4 types de risques potentiels pour l'environnement sont liés à l'expérimentation de porte-greffes de vigne transgéniques en milieu non confiné. Nous avons cherché et continuerons à limiter leur impact :

1. Dissémination de séquences fonctionnelles vers les bactéries du sol

Le plasmide pRCPI utilisé par réaliser la transformation génétique étant d'origine bactérienne, nous avons vérifié, pour chacun des 5 évènements de transformation retenus pour l'expérimentation, que la partie transférée à la plante ne comporte pas de séquences autre que celle du T-DNA, en particulier pas d'origine de replication bactérienne. De ce fait, le transfert et la mobilisation de séquences issues des transgènes vers les bactéries du sols sont improbables.

2. Dissémination des transgènes par le pollen

L'essai est réalisé avec des porte-greffes de vigne transgéniques qui ne produiront pas d'inflorescences. De plus, la variété 41 B de porte-greffe sélectionnée pour la dissémination est femelle et les éventuels rejets qui pourraient se développer sur les porte-greffes seront systématiquement éliminés puis détruits. De ce fait, il est impossible que les transgènes puissent être disséminés par flux de pollen.

3. Dissémination des transgènes par la graine

Les plants de vigne disséminés sont constitués d'un greffon installé sur un porte-greffe. Après greffage, le greffon a un développement strictement végétatif pendant au moins 2 années avant d'induire le développement de fleurs en 3ème voire 4ème année. Dans notre essai, les éventuels rejets qui pourraient se développer sur les porte-greffes transgéniques seront éliminés puis détruits ainsi que les inflorescences du greffon non-transgénique greffé sur les porte-greffes transgéniques, ces inflorescences se développant en fin d'expérimentation (2007-2008). De ce fait, aucun raisin ne se développera sur les plants de vigne transgéniques et il est impossible que les transgènes puissent être disséminés par la graine.

4. Dissémination de séquences fonctionnelles du virus

Les porte-greffes de vigne transgéniques expriment le gène codant la protéine de capsid du GFLV. De ce fait, il est envisageable que des événements de recombinaison ARN-ARN puissent avoir lieu entre les ARN viraux d'isolats de GFLV infectant les plantes transgéniques et les ARNm dérivés du transgène d'origine viral et exprimés par les porte-greffes transgéniques. De tels phénomènes ont été décrits avec des plantes herbacées transgéniques infectées avec des virus défectifs en condition de laboratoire. Toutefois, la recombinaison n'a jamais été observée en plein champ avec des plantes transgéniques, notamment dans le cas des porte-greffes de vigne

transgéniques, dont ceux proposés dans ce dossier de demande d'avis qui ont été expérimentés au vignoble de 1996 à 1999 (dossier CGB n° B/FR/96. 03.14) (Vigne *et al.*, 2004)

I. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bardonnnet, N., Hans, F., Serghini, M.A. and Pinck, L. Protection against virus infection in tobacco plants expressing the coat protein of grapevine fanleaf nepovirus. *Plant Cell Reports* 13:357-360 (1994).
- Baulcombe, D., Saunders, G.R., Bevan, M.W., Mayo, M.A. and Harrison, B.D. Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature* 321:446-449 (1986).
- Bevan, M. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research* 12:8711-8721 (1984).
- Cour, P., Duzer, D., and Planchais, N. Analyses polliniques de l'atmosphère de Montpellier. Document correspondant à la phénologie de la floraison de la vigne en 1972. *Naturalia mospeliensa. Ser. Bot.* 23-24:225-229 (1973).
- Mauro, M.C., Toutain, S., Walter, B., Pinck, L., Otten, L., Coutos-Thevenot, P., Deloire, A. & Barbier, P. High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene. *Plant Science* 112, 97-106 (1995).
- Fuchs, R.L., Ream, J.E., Hammond, B.G., Maylor, M.W., Leimbürger, R.M. and Berberich, S.A. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPT II) protein. *Bio/Technology* 11: 1543-1547 (1993).
- Fuchs, M. and Gonsalves, D. Resistance of transgenic squash Pavo ZW-20 expressing the coat protein genes of zucchini yellow mosaic virus and watermelon mosaic virus 2 to mixed infections by both potyviruses. *Bio/Technology* 13:1466-1473 (1995).
- Huglin, P. Le développement des raisins: De la fleur au fruit. *Biologie et Ecologie de la vigne.* p. 125-139. Editions Payot, Lausanne (1986).
- Mc Donnell, R.E. Clark, R.D., Smith, W.A. and Hinchee, M.A. A simplified method for the detection of neomycin phosphotransferase II activity in transformed plant tissues. *Plant Mol Biol Rep* 5:387-405 (1987).
- Nap, J-P., Bijvoet, J. and Stiekema, W.J. Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants. *Transgenic Research* 1:239-249 (1992).
- Peng, J., Wen, F. and Hodges, T.K. A rapid method for qualitative assay for both neomycin phosphotransferase II and -glucuronidase activities in transgenic plants. *Plant Mol Biol Rep* 11:38-47 (1993).
- Planchais, N. Apports de l'analyse pollinique à la connaissance de l'extension de la vigne au quaternaire. *Naturalia mospeliensa, ser. Bot.* 23-24:211-223.
- Serghini, M.A., Pinck, M. and Pinck, L. *In vitro* expression of a chimeric coat protein gene from grapevine fanleaf virus (strain F13). *Arch. Virol.* 117:297-304 (1991).
- Serghini, M.A., Fuchs, M., Pinck, M., Reinbolt, J., Walter, B. & Pinck, L. RNA2 of grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. *Journal of General Virology* 78:3171-3176 (1990).
- Spielmann, A., Krastanova, S., Douet-Orhant V. & Gugerli, P. Analysis of transgenic grapevine (*Vitis rupestris*) and *Nicotiana benthamiana* plants expressing an *Arabidopsis thaliana* coat protein gene. *Plant Science* 156:235-244 (2000).
- Vigne, E., Komar, V. & Fuchs, M. Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of *Grapevine fanleaf virus*. *Sous presse* (2004).
- Walter, B. & Etienne, L. Detection of the grapevine fanleaf viruses away from the period of vegetation. *J. Phytopathology* 120, 355:364 (1987).
- Yadav, N.S. Vanderleyden, J., Bennett, D.R., Barnes, W.M. and Chilton, M.D. Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti Plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:6322-6336 (1982).

Tableau 1. Caractéristiques des lignées transgéniques du porte-greffe de vigne 41 B sélectionnées pour la dissémination en milieu non confiné.

Evénements de transformation	Nombre d'insertions du gène CP du GFLV ^a	PCR bordure gauche ^b	Expression CP mRNA ^c	Expression CP ^d
68	2	0	+	+
77	2	0	+	+
206	1	0	+	0
219	1	0	+	0
240	1	0	+	+

^aLe nombre d'insertions du gène codant la protéine de capsid (CP) du *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) a été déterminé par Southern blot après digestion de l'ADN génomique par l'enzyme de restriction Hind III, transfert sur membrane de nylon et hybridation avec une ribosonde CP marquée au Dig-dUTP (Figure 2).

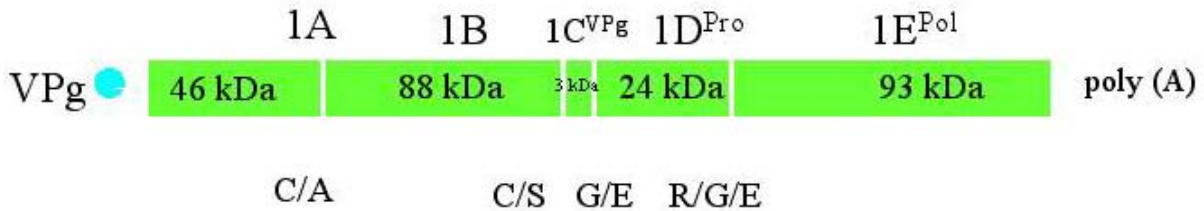
^bLa possibilité d'intégration dépassant la bordure gauche du T-DNA a été testée par PCR avec un couple d'amorces situées de part et d'autre de la bordure gauche du T-DNA. "0": aucun fragment d'ADN amplifié en PCR.

^cL'accumulation des ARNm du gène CP a été analysée par Northern blot à partir d'ARN totaux séparés par électrophorèse en gel d'agarose dénaturant, transfert sur membrane de nylon et hybridation avec une ribosonde marquée au Dig-dUTP.

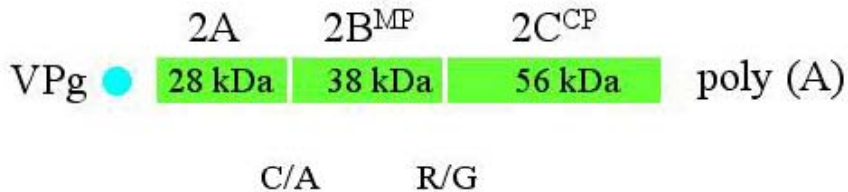
^dL'expression du gène CP a été testée par ELISA avec des immunoglobulines spécifiques du GFLV. "0" aucune expression détectable de la CP en ELISA; "+" expression détectable de la CP en ELISA.

Figure 1a. Organisation génomique du GFLV. Les 2 ARNs génomiques, polyadénylés en 3' (poly-A) et liés à une protéine VPg en 5', sont traduits en 2 polyprotéines qui après clivages protéolytiques (sites indiqués par les amino-acides C/A/S/G/E/R) donnent les protéines fonctionnelles identifiées suivantes : Pro : protéinase, Pol : polymérase, MP : protéine de mouvement et CP : protéine de capsid.

ARN 1 (7342 nt / 253 kDa)



ARN 2 (3774 nt / 122 kDa)



ARN 3 satellite (1114 nt / 37 kDa)

Figure 1b. Construction génétique utilisée pour la transformation du porte-greffe 41 B de vigne. LB : bordure gauche , p35S : promoteur 35S, CP : capsidie protéique, tnos : terminateur NOS, NptII : néomycine phosphotransférase II, pnos : promoteur NOS, RB : bordure droite

Figure 2. Caractérisation de l'intégration du gène de la protéine de capsid (CP) du *Grapevine fanleaf virus* par Southern blot avec une ribosonde CP du GFLV marquée au Dig-dUTP après digestion par Hind III de l'ADN génomique extrait de feuilles de chacun des cinq événements de transformation proposés pour la dissémination (68, 77, 206, 219 et 240).

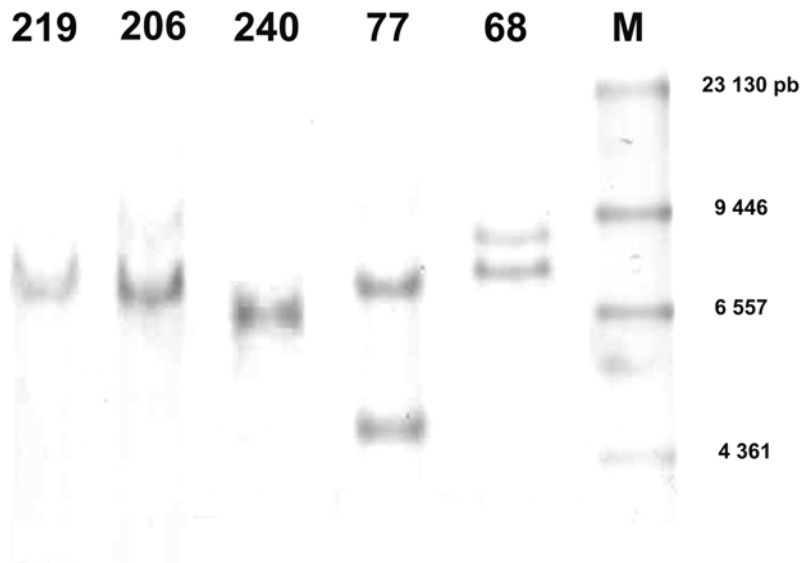
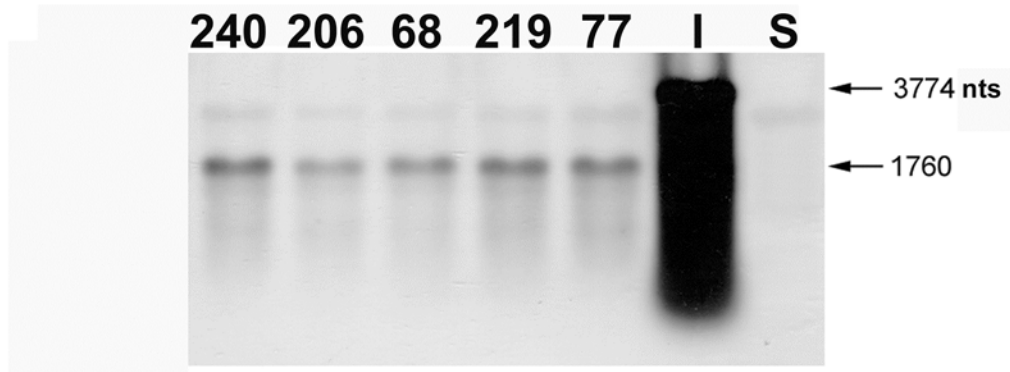


Figure 3. Caractérisation de l'expression du gène de la protéine de capsid du *Grapevine fanleaf virus* par Northern blot avec une ribosonde CP du GFLV marquée au Dig-dUTP à partir d'ARN totaux extraits de feuilles de chacun des cinq événements de transformation proposés pour la dissémination (68, 77, 206, 219 et 240). La taille des mRNAs correspondant au transgène CP est indiquée (1760 nts) ainsi que la taille de l'ARN2 viral (3774 nts) détecté dans une plante infectée par le GFLV (I). L'échantillon S correspond à une plante saine non-transgénique.



Annexe. Analyse physique du sol du Domaine Expérimental Agricole et Viticole du Centre de Recherche de l'INRA de Colmar.

Type	Horizon (cm)						
	0-25	25-65	65-80	80-110	110-140	140-155	155-180
Argile	20	19,8	16,6	10,2	11,2	10,2	8,1
Limon	25,2	24,6	21,2	18,9	19,7	21,5	19,4
Sable très fin	35,2	36,2	31,0	30,4	35,1	37,0	35,5
Sable fin	3,5	3,6	3,8	3,8	3,3	4,6	7,0
Sable grossier	2,7	1,5	0	0,5	1,1	2,8	15,5
Calcaire	10,5	12,6	26,0	35,7	29,1	23,4	14,0
Matières organiques	2,9	1,7	1,4	0,5	0,5	0,5	0,5

Ces analyses ont été réalisées par la Station d'Agronomie de l'INRA de Colmar. Les données sont exprimées en pourcentage de terre fine sèche.

Annexe. Couverture phytosanitaire proposée pour les plants de vigne transgéniques et non-transgéniques disséminés sur le Domaine Expérimental Agricole et Viticole du Centre de Recherche de l'INRA de Colmar.

Application	Mois	Parasite cible	Matière active	Dose
1 & 2	mai	M	chlorothamonil + cymoxanyl + folpel	400 g/ha 120 g/ha 400 g/ha
		O	soufre mouillable	10 kg/ha
3	début juin	M	chlorothamonil + cymoxanyl + folpel	400 g/ha 120 g/ha 400 g/ha
		O	flusilazole	30 g/ha
4	mi-juin	M & O	dichlofluanide	4 kg/ha
5 & 6	début juillet	M & O	cymoxanyl + propinèbe + triadiméphon	120 g/ha 1450 g/ha 50 g/ha
7	fin juillet	M	cuivre + manèbe + zinèbe	120 g/ha 40 g/ha 40 g/ha
		O	flusilazole	30 g/ha

M = mildiou

O = oïdium

La protection phytosanitaire pratiquée au Domaine Expérimental Agricole et Viticole de l'INRA de Colmar est de type raisonnée. Les traitements sont organisés en fonction de la pression de chaque parasite et du risque qu'il représente pour la culture de la vigne. Les sept traitements mentionnés ci-dessus sont indicatifs des pratiques d'une année moyenne.