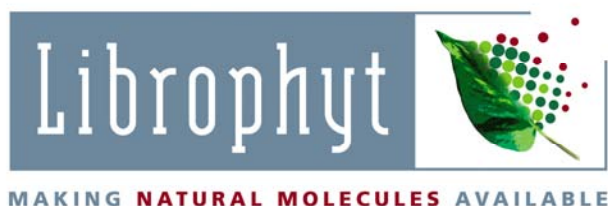


Demande d'autorisation auprès de la Commission d'Etude de la  
Dissémination des Produits issus du Génie Biomoléculaire

Essai au champ pluriannuel de tabac dont la  
production en cembranes a été fortement  
diminuée par ARN interférence

**Dossier Scientifique et Technique**

**Présenté par la société LIBROPHYT**



## **PREAMBULE**

Cette demande d'expérimentation est déposée dans le cadre de la réglementation européenne décrite dans la directive 90/220/CEE, transposée en droit français par la loi du 13 juillet 1992. Cette directive a été modifiée le 21 avril 2001 par la directive 2001/18/CE. Ces textes régissent la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés, que ce soit à des fins de mise en marché ou à d'autres fins et notamment à des fins de recherche.

La demande qui fait l'objet de ce dossier concerne un essai dont les résultats attendus doivent permettre de valider des hypothèses scientifiques et techniques. Il s'agit d'un premier essai en champ pour cet événement de transformation; il fait suite à de nombreuses expérimentations en serre. Il permettra d'évaluer, dans des conditions agronomiques normales, le niveau de production de terpénoïdes par les feuilles du tabac modifié.

Conformément à la directive 2001/18, l'importance de la dissémination et les conditions de son déroulement prennent en compte le stade de développement du projet et l'information scientifique disponible. S'agissant d'un projet nouveau, les plantes ont été caractérisées par des études moléculaires; la stabilité d'expression des caractères introduits dans les plantes a été observée durant plusieurs générations en serre.

**SOMMAIRE**

**PREAMBULE..... 2**

**RESUME DES POINTS PRINCIPAUX ..... 4**

**INTRODUCTION ..... 5**

**A. INFORMATIONS D'ORDRE GENERAL ..... 8**

**B. INFORMATIONS CONCERNANTS LES PLANTES RECEPTRICES ..... 8**

**C. MODIFICATION GENETIQUE DES PLANTES ..... 10**

**D. INFORMATIONS CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE .. 11**

**E. INFORMATION CONCERNANT LE SITE DE DISSÉMINATION ..... 15**

**F. INFORMATIONS CONCERNANT LA DISSEMINATION ..... 15**

**G. MESURES DE PREVENTION DE DISPERSION ..... 17**

**H. INFORMATIONS SUR LES EVENTUELLES INCIDENCES DE LA DISSEMINATION SUR  
L'ENVIRONNEMENT..... 18**

**REFERENCES ..... 20**

## RESUME DES POINTS PRINCIPAUX

**Notifiant: Librophyt SAS.**

**Titre :** Dossier de demande d'avis pour des essais au champ pluriannuels de tabac dont la production en cembranes a été fortement diminuée par ARN interférence

**Objectif de la transformation :** Réduire la production des terpènes de type cembrane excrétés par les trichomes glandulaires des feuilles de tabac.

**Espèce végétale réceptrice :** *Nicotiana tabacum cv basma drama*

**Gène(s) d'intérêt introduit(s) et séquences de contrôle :** fragment d'un gène de tabac sous le contrôle du promoteur du même gène.

**Autres séquences introduites :** Gène de sélection conférant une résistance à l'hygromycine sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression constitutive. La présence d'un intron dans le gène empêche toute expression dans les organismes procaryotes.

**Durée du projet :** Expérimentation pluriannuelle prévue durant 3 campagnes de culture du tabac, d'avril 2006 à octobre 2008.

**Localisation probable des disséminations :** Départements de la Haute Marne et/ou de la Somme

**Précautions envisagées :** Ecimage des tabacs avant floraison, destruction par broyage des résidus de culture à la fin de la récolte, aucune culture commerciale de tabac ne sera introduite sur le site l'année suivante, suivi régulier d'éventuelles repousses l'année suivant l'expérimentation.

**Résumé des expériences antérieures :** Il n'y a pas d'expériences antérieures.

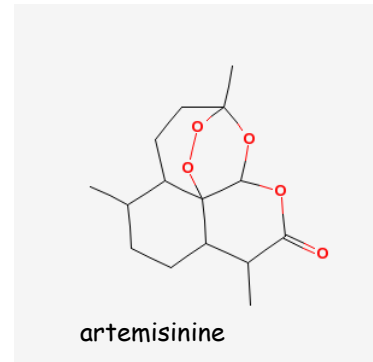
**Objectif de l'essai :** Evaluer la production de terpènes dans les exsudats des feuilles de tabac dans des conditions agronomiques en plein champ.

**Nombre et surface des essais :** 1 essai de 6000 plantes sur une surface de 2000 m<sup>2</sup> /an.

## INTRODUCTION

### Généralités sur les terpènes

Les terpènes sont l'une des classes de métabolites les plus importantes dans le règne végétal. Ces composés interviennent aussi bien dans le métabolisme primaire (ex : biosynthèse de plusieurs hormones végétales) que dans le métabolisme secondaire (ex : production de phytoalexines). En conséquence, ils jouent un rôle dans des processus aussi diversifiés que la pollinisation des fleurs en tant qu'attractant pour les insectes, les interactions avec les microorganismes en tant que phytoalexines ou chemo-attractant, dans la pigmentation des tissus, ou encore dans le développement de la plante. Les terpènes peuvent s'accumuler en grande quantité dans certains tissus de la plante. Par exemple, les trichomes de la menthe accumulent du menthol, les canaux résinifères de nombreux conifères produisent une résine contenant différents terpènes (pinène, abietadiène, etc.). De nombreuses applications industrielles utilisent les propriétés de ces molécules. Les terpènes sont utilisés dans l'industrie des arômes et fragrances en rentrant dans la composition de nombreux parfums ou en tant qu'additifs aromatiques dans l'industrie agroalimentaire. Certains terpènes sont également connus pour leurs propriétés pharmaceutiques. On peut citer (i) le Taxol®, un diterpène extrait de l'if, qui est utilisé en chimiothérapie dans les traitements contre certains types de cancer et (ii) l'artémisinine, un sesquiterpène extrait de l'armoise annuelle, et utilisé dans le traitement du paludisme. Cependant, le coût de production de ces molécules est parfois très élevé en raison (i) de la difficulté de les synthétiser par voie chimique (ii) de leur faible concentration dans la plante (iii) de la raréfaction de la plante source.



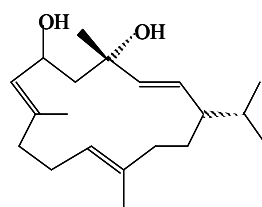
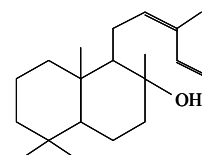
Librophyt est une jeune société de biotechnologie qui propose, entre autres, des solutions alternatives pour rendre ces molécules plus disponibles en diminuant leur coût de production. La stratégie de Librophyt repose sur l'utilisation des trichomes de tabac comme usine végétale de production.

### Les trichomes

Comme de nombreuses plantes supérieures, les feuilles de tabac possèdent à leur surface des structures spécialisées dénommées trichomes. Ceux-ci sont divisés en trichome simples, hydathodes et trichomes sécréteurs « GST » (photo ci-contre)



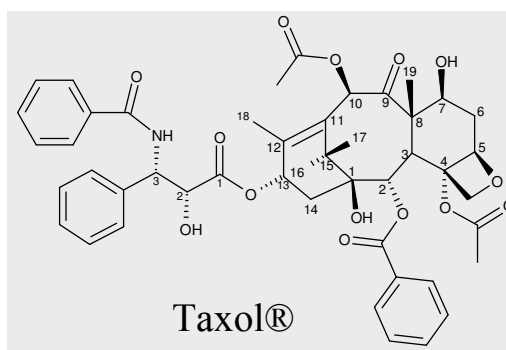
Chez le tabac cultivé (*N. tabacum*), les trichomes de type sécréteurs sont responsables de la production de deux familles de terpènes, les cembranes et les labdanes. Les cembranes comprennent l'alpha et le beta-cembratriene-diol (CBT-diols). Le labdane majeur produit est l'abienol. Ces molécules sont synthétisées dans les cellules glandulaires situées à la tête du trichome et excrétées à la surface de la feuille. Dans certaines variétés, le taux global de terpènes excrétés peut représenter jusqu'à 10% du poids sec de la plante. Cependant, la quantité relative de ces deux molécules est très variable d'une variété de tabac à l'autre. D'un point de vue général, la plupart des variétés contiennent du CBT-diol alors que la présence d'abienol est beaucoup plus variable et que son taux est relativement faible voire absent dans de nombreuses variétés.

 $\alpha$ -Cembratriene-diol

(Z)abienol

### Voie de biosynthèse des terpènes cycliques

La voie de biosynthèse des terpènes a largement été décrite dans la littérature. La première étape est réalisée par des prényltransférases qui vont par condensation de deux précurseurs l'isopentenyl diphosphate (IPP) et son isomère, le diméthylallyl diphosphate (DMAPP) générer des chaînes de carbones constituées d'unités isoprényle (C5) de longueur variable. Ainsi, l'addition séquentielle d'une unité d'IPP à un DMAPP produit du géranyl diphosphate (GPP, C10), du farnésyl diphosphate (FPP, C15) et du géranyl géranyl diphosphate (GGPP, C20). Ces chaînes de prényl diphosphates de longueur variable sont les substrats d'une classe d'enzyme, les terpènes synthase qui permettent la formation du squelette de base des terpènes cycliques en C10 (monoterpène), C15 (sesquiterpène), C20 (diterpène), C30 (triterpène)... La diversité de réaction de ces enzymes est à l'origine de la diversité des squelettes terpéniques cycliques que l'on retrouve dans la nature. Enfin, ces molécules vont parfois devenir plus complexes suite à des modifications par hydroxylation, acétylation, benzylation pour les modifications les plus fréquentes. Le Taxol® qui est obtenu à partir de l'écorce de l'if est un exemple de molécule particulièrement complexe (cf figure ci-contre).



Taxol®

### Voie de biosynthèse du CBT-diol chez le tabac

Les cembranes sont formés par cyclisation du GGPP par la CBT-ol synthase (CBTS) pour former du CBT-ol. (Wang *et al.*, 2002). Celui-ci est ensuite hydroxylé afin de donner du CBT-diol. Cette réaction est catalysée par une mono-oxygénase à cytochrome P450, codée par le gène CYP71D16 (Wang *et al.*, 2001). Cette voie de biosynthèse est spécifiquement localisée au niveau des trichomes sécréteurs de la plante. En particulier, il a été démontré que les promoteurs de ces deux gènes dirigent spécifiquement l'expression de ces gènes dans ces tissus.

## Objectifs du projet

Notre objectif est d'obtenir une lignée de tabac avec un taux réduit de CBT-diol. En utilisant la stratégie d'extinction de gène (« gene silencing ») par la technique d'expression d'ARN double brin, connue sous l'appellation *intron hairpin RNA interference* ou *ihpRNAi* décrite par Smith et *al.* (2000), la production de CBT-diol a été très fortement diminuée dans des lignées de tabac de la variété *Nicotiana tabacum cv basma drama*.

Cette dissémination a pour but d'évaluer dans des conditions de plein champ :

(i) le niveau de production en terpènes secrétés à la surface des feuilles des tabacs génétiquement modifiés en comparaison avec les plantes non modifiées.

(ii) d'étudier le comportement de ces plantes en termes de croissance et développement en fonction de paramètres agronomiques (irrigation et densité de culture)

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

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

Librophyt SAS, centre de Cadarache, Bâtiment 185, 13115 St-Paul-Lez-Durance.

### **A.2 Qualification et expérience des responsables scientifiques**

- Docteur en biologie moléculaire et cellulaire végétale en 1993. Il possède l'habilitation à diriger des recherches (2001). Expérience de 18 ans dans le domaine de la biologie moléculaire végétale.

- Docteur en phytopathologie moléculaire en 1994. Expérience en biologie moléculaire végétale depuis 16 ans.

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

Dossier de demande d'avis pour des essais pluriannuels au champ de tabac dont la production en cembranes des exsudats de feuilles a été fortement diminuée par ARN interférence.

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

Cette expérimentation au champ s'inscrit dans un programme d'évaluation ayant pour objectif la production de molécules de type terpénique par le tabac pour l'industrie de la chimie fine.

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

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

Nom de famille : *Solanaceae*

Genre : *Nicotiana*

Espèce : *tabacum*

Sous-espèce : *non disponible*

Cultivar / lignée : *Basma drama*

Nom usuel : Tabac

### **B.2 Informations concernant la reproduction**

#### **B.2.a Information concernant la reproduction du tabac**

##### *i) Mode de reproduction*

En milieu naturel, le tabac se multiplie par reproduction sexuée.

##### *ii) Facteurs spécifiques affectant la reproduction :*

La fleur de tabac est hermaphrodite, la pollinisation se fait principalement par auto pollinisation.

*iii) Temps de génération :*

Le tabac est une plante annuelle dont le cycle de culture peut varier de 3 à 6 mois à partir de la mise en champs des plantules.

**B.2.b Compatibilités sexuelles avec d'autres espèces sauvages ou cultivées :**

Il n'existe pas d'espèces sauvages sexuellement compatibles en France. Les tabacs cultivés ne se croisent pas avec des espèces d'un genre autre que *Nicotiana*. Les croisements interspécifiques spontanés à l'intérieur du genre *Nicotiana* sont d'autre part extrêmement rares (Delon, 1993).

**B.3 Capacité de survie**

**B.3.a Capacité à former des structures de survie ou de dormance**

Les plantes de tabac ne se développent spontanément que très rarement en plein champ. Un semis direct au champ est quasiment impossible du fait de la compétition avec les mauvaises herbes. La culture du tabac est donc réalisée en plusieurs étapes. Une première opération consiste à effectuer un semis sur terreau. Les jeunes plantules sont ensuite repiquées sur un plateau flottant, et enfin transplantées au champ au cours d'une troisième étape.

**B.3.b Le cas échéant, facteurs spécifiques affectant la capacité de survie.**

Dans les régions de culture où durant les mois d'hiver la température est souvent inférieure à 0°C, le tabac ne peut subsister que par l'intermédiaire des graines. Les parties végétatives de la plante sont en effet sensibles au gel.

**B.4 Dissémination**

**B.4.a Voies et étendue de la dissémination de la plante réceptrice**

Le tabac, en Europe, n'est qu'une espèce cultivée, sa dissémination n'intervient que dans les espaces agricoles par repiquage en champ de plantules obtenues en serre. Ce n'est pas une plante comestible, il n'est donc pas présent dans la filière alimentaire. De plus, les surfaces de culture de tabacs sont réglementées en France.

**B.4.b Facteurs spécifiques affectant la dissémination**

Parmi les facteurs pouvant favoriser les fécondations croisées, les insectes jouent un rôle important car la fleur de tabac contient un nectar abondant. Dans une moindre mesure, on peut citer également le vent mais son impact est limité car le pollen n'est jamais entraîné à plus de 20 mètres de la plante d'origine (Delon, 1993).

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

Les variétés du genre *Nicotiana* sont originaires de zones plutôt chaudes. Toutefois, elles peuvent se développer dans une zone s'étendant de 60° de latitude Nord à 40° en dessous de l'équateur et sont actuellement cultivées dans presque toutes les régions du monde. Elles préfèrent généralement les sols légers, sablonneux et une température extérieure oscillant entre 15°C et 30°C, l'idéal se situant aux alentours de 25°C. Les principaux pays producteurs sont la Chine, les Etats-Unis, l'Inde, le Brésil, la Turquie, le Zimbabwe et la Malawi. En Europe, l'Italie et la Grèce arrivent en tête des pays producteurs. En France, le tabac est cultivé principalement dans les régions Aquitaine, Alsace, Midi-Pyrénées, Charente-Poitou, et Rhône-Alpes.

## **B.6 Description de l'habitat naturel de la plante pour les plantes ne poussant pas dans la communauté européenne y compris les informations sur les prédateurs naturels, les concurrents et les symbiotes**

### *i)Habitat naturel :*

Le tabac est originaire d'Amérique du Sud où il était connu des civilisations précolombiennes il y a déjà plus de 2000 ans. Le tabac fut dans un premier temps importé en Amérique du Nord par l'intermédiaire des Mayas, ce qui lui permit d'être connu des communautés indiennes qui habitaient la région à l'époque. Pendant plusieurs siècles, le tabac a été uniquement cultivé sur le continent américain. Il n'en sortit qu'à partir de 1492 quand l'explorateur Christophe Colomb le ramena en Europe sous la forme de graines et de plants.

[<http://r0.unctad.org/infocomm/francais/tabac/descript.htm>]

### *ii)Prédateurs naturels, concurrents et symbiotes*

Comme toutes les plantes, le tabac est sensible à de nombreux parasites et ravageurs causant une destruction partielle ou totale des plantes. On peut citer, par exemple, la larve verte de coléoptère de juin (*Cotinis nitada*, L.), les Noctuelles, les puces (coléoptères) tels que *Epitrix hirtipennis* (Coleoptera, Chrysomelidae), les sauterelles (dont *Melanoplus differentialis*), la pourriture noire des racines (*Thielaviopsis basicola*), Le dépérissement par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *Nicotianae*, La mosaïque du tabac (Tobacco mosaic virus), la nécrose du tabac (*Phytophthora parasitica* var. *nicotiana*), l'orobanche rameuse (*Orobanche ramosa* L.), Le puceron du tabac (*Myzus nicotianae*). Une description succincte de ces maladies est donnée sur le site <http://r0.unctad.org/infocomm/francais/tabac/culture.htm#ravageurs>.

## **B.7 Autres interactions potentielles, pertinentes pour l'OGM, de la plante avec des organismes dans l'écosystème habituel, ou ailleurs, y compris les informations sur sa toxicité pour les hommes, les animaux et les autres organismes**

Pendant sa culture, le tabac peut être en interaction avec l'ensemble des ravageurs et pathogènes présentés plus haut (cf §B.6) qui peuvent être présents dans le sol, dans ses propres tissus ou à sa surface. Il n'y a pas de raisons particulières pouvant laisser penser que la PSGM se comporte différemment de la plante sauvage.

## **C. MODIFICATION GENETIQUE DES PLANTES**

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

Les plantes faisant l'objet de cette demande ont été obtenues par la technique de transformation génétique utilisant *Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie a la propriété de réaliser naturellement la transformation génétique d'une plante en transférant une partie de son ADN dans la plante (T-DNA) afin de la parasiter. La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 utilisée dans cette expérience est une souche désarmée dont une partie des gènes, localisée sur le plasmide Ti et responsable de la formation du « crown gall », a été éliminée.

Le vecteur binaire [pLIBRO-09] qui porte les transgènes sur son T-DNA a été introduit par électroporation dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Les transformations ont été réalisées sur *N. tabacum* cv. *basma drama* par inoculation de disques foliaires selon le

protocole de Horsch *et al.*, (1985) avec la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 possédant le vecteur binaire pLIBRO-09. Les transformants, à savoir les plantes ayant intégré au moins une copie du T-DNA, ont été sélectionnés pour leur aptitude à se développer sur une dose de 50 mg/l d'hygromycine.

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

Le plasmide binaire pLIBRO-09 contenant les transgènes a été utilisé pour obtenir l'évènement de transformation qui fait l'objet de ce dossier. Il est dérivé du vecteur pCAMBIA1300int (n° GenBank : AF294976). Il contient un gène de résistance à l'hygromycine qui possède un intron limitant ainsi son expression à des organismes eucaryotes.

## **C.3 Taille, origine (nom) des organismes donneurs et fonction voulue de chaque fragment constituant de la région envisagée pour le transfert**

*Les informations détaillées concernant la taille, l'origine et la fonction voulue de chaque fragment constituant de la région T-DNA transférés dans la plante ont été fournies aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire chargée de l'évaluation de cette demande mais ne sont pas disponibles ici compte tenu des obligations liées à la protection industrielle.*

# **D. INFORMATIONS CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE**

## **D.1 Description des caractères et des caractéristiques qui ont été introduits et modifiés**

Les tabacs génétiquement modifiés produisent un double brin d'ARN d'un fragment d'un gène de tabac impliqué dans la synthèse des terpènes sécrétés à la surface des feuilles. Il n'y a pas de nouvelle protéine produite. L'introduction de ce transgène a pour effet de diminuer très fortement la production de la protéine endogène par le phénomène d'extinction génique médié par le mécanisme des ARN interférents (Smith *et al.*, 2000).

Les tabacs produisent également l'hygromycine phosphotransférase dans les tissus où s'exprime le promoteur ubiquitaire CaMV 35S.

## **D.2 Informations sur les séquences réellement transférées**

Le tabac #1223 portant le T-DNA du plasmide pLIBRO-09 a été sélectionné pour réaliser cet essai.

*Les informations détaillées concernant la taille, l'origine et la fonction voulue de chaque fragment constituant de la région T-DNA transférés dans la plante #1223 ont été fournies aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire chargée de l'évaluation de cette demande mais ne sont pas disponibles ici compte tenu des obligations liées à la protection industrielle.*

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

*Les informations détaillées concernant l'expression de l'insert ont été fournies aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire chargée de l'évaluation de cette demande mais ne sont pas disponibles ici compte tenu des obligations liées à la protection industrielle.*

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

#### D.4.a Mode(s) et/ou vitesse de reproduction ;

Le développement observé lors des expérimentations en serre ainsi que la vitesse de reproduction ne sont pas modifiés par l'introduction de l'insert dans les plantes étudiées par rapport à la plante sauvage.

#### D.4.b Dissémination

Aucune altération de la fertilité des plantes modifiées n'a été observée en milieu confiné. Par conséquent, la dissémination des plantes modifiées est supposée identique à celle de la plante réceptrice.

#### D.4.c Capacité de survie

Les expériences réalisées en serre n'ont pas montré une capacité de survie différente de celle de la plante réceptrice. Les graines récoltées ont un pouvoir germinatif identique à la plante réceptrice.

### **D.5 Stabilité génétique des inserts et stabilité phénotypique de la PSGM.**

Les caractères étudiés sont transmissibles à la descendance suivant les lois de Mendel. La lignée T1 #1223 a été rendue homozygote par autofécondation du transformant primaire #964. L'analyse de ségrégation des descendants de cette lignée sur un milieu contenant de l'hygromycine a confirmé l'homozygotie de la lignée #1223. Les expériences réalisées en serre sur la génération suivante ont montré que le phénotype lié à l'intégration du transgène était identique aux parents des générations précédentes. En conclusion, le phénotype lié au caractère introduit est stable dans la descendance.

### **D.6 Possibilité de transfert de matériel génétique des plantes génétiquement modifiées dans d'autres organisme**

#### D.6.a Transfert horizontal de matériel génétique depuis la PSGM vers d'autres organismes

Il n'existe pas de publication scientifique ayant apporté la preuve qu'un transfert d'un gène de plante vers un microorganisme soit possible en conditions naturelles. La communauté scientifique y compris de nombreux experts indépendants des différents organismes internationaux (O.C.D.E., O.M.S, U.E....) a statué dans ce sens, <http://europa.eu.int/comm/research/quality-of-life/gmo/index.html>, projet BIOT-CT91-0282.

La Commission de Génie Génétique et de la Commission du Génie Biomoléculaire indiquent également que la probabilité de transfert d'un gène de résistance à un antibiotique depuis une plante supérieure à une bactérie est très faible voire nulle:

<http://www.recherche.gouv.fr/commis/genetique/antibio/defaultb.htm>

De plus, la présence d'un intron dans le gène empêche toute expression du gène dans un organisme procaryote.

Dans l'état actuel des connaissances, les tabacs génétiquement modifiés ne sont donc pas susceptibles de transférer une partie de leur matériel génétique chez des organismes vivants autres que le tabac.

#### D.6.b Transfert interspécifique ou intergénérique

Ce mode de transfert n'est pas envisageable étant donné qu'il n'y a pas d'espèces apparentées, sauvages ou cultivées, en Europe.

#### D.6.c Transfert intraspécifique

Les plantes génétiquement modifiées ont le même comportement vis-à-vis de l'émission de pollen que leurs équivalents non modifiés. Bien que le tabac soit principalement autogame, le transfert du pollen par les insectes ou le vent vers d'autres plantes non transgénique est possible en particulier avec les tabacs cultivés. Cependant, dans cette expérience, les plants de tabac seront récoltés avant la formation du pollen. En conclusion, il est donc impossible que ces plantes transgéniques se croisent avec d'autres tabacs.

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

Dans le cas d'une commercialisation éventuelle ultérieure, la PSGM n'est pas destinée à l'alimentation humaine. Cette PSGM sera utilisée pour la production d'une molécule de l'exsudat comme précurseur de synthèse en chimie fine. L'extrait de cette molécule purifiée ne contiendra ni ADN ni protéines. Par ailleurs, la molécule purifiée est une molécule déjà présente dans le tabac et pour laquelle aucun effet toxique ou allergisant n'est connu.

En aucun cas, cet essai ne sera destiné à une commercialisation du produit dérivé de la PSGM.

### **D.8 Information concernant la sécurité de la PSGM pour la santé des animaux notamment en ce qui concerne tout effet toxique, allergisant ou autre effet nocif résultant de la modification génétique, lorsque la PSGM est destinée à être utilisée dans l'alimentation des animaux**

La PSGM n'est pas destinée à l'alimentation des animaux

### **D.9 Mécanisme d'interaction entre la plante génétiquement modifiée et les organismes cibles (le cas échéant)**

Il n'y a pas d'organisme cible dans cette étude.

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

Il n'y a pas d'interactions potentiellement significatives connues avec des organismes non-cibles. Etant donné que la modification introduite, en dehors de la protéine hygromycine phosphotransférase, ne résulte pas en l'apparition de nouvelles molécules, mais simplement en le changement de la proportion relative de molécules présentes dans la plante réceptrice, aucune

modification potentielle des interactions de la PSGM avec des organismes non-cibles n'est attendue.

Il faut également noter que le mécanisme d'extinction par ARN interférence est un mécanisme très spécifique de la séquence introduite. Celle-ci correspond à un gène endogène du tabac et la probabilité de trouver une séquence 100% identique dans un autre organisme est quasi nulle.

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

Aucune interaction négative avec l'environnement abiotique ne peut être liée à la modification génétique introduite.

#### **D.12 Description des méthodes de détection et d'identification de la PSGM**

L'identification de la PSGM peut être réalisée de plusieurs manières. La plus fiable consiste à réaliser une identification moléculaire. Dans une première étape, l'ADN génomique de la plante sera isolé à partir d'un échantillon de feuille. Dans une seconde étape, une amplification de la séquence génomique flanquante de la bordure gauche ou droite du T-DNA sera réalisée avec les amorces spécifiques de la région génomique flanquante droite ou gauche et les amorces spécifiques du T-DNA. Le séquençage du fragment d'ADN amplifié, si amplification il y a, permettra de confirmer sans ambiguïté si la plante correspond à la lignée #1123.

#### **D.13 Informations, le cas échéant, sur les précédentes disséminations de la PSGM**

Les PSGM présentées dans ce dossier n'ont jamais été testées en champ.

## **E. INFORMATION CONCERNANT LE SITE DE DISSÉMINATION**

Le site sera indiqué dans les meilleurs délais dès qu'il sera connu par le demandeur. Par conséquent, cette section sera renseignée lorsque le site sera connu.

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

### **E.2 Description de l'écosystème des sites de dissémination, y compris le climat, la flore et la faune.**

### **E.3 Présence d'espèces apparentées sauvages sexuellement compatibles ou d'espèces végétales cultivées sexuellement compatibles.**

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

## **F. INFORMATIONS CONCERNANT LA DISSEMINATION**

### **F.1 Objectif de la dissémination**

Cette dissémination a pour but d'évaluer dans des conditions de plein champ :

(i) le niveau de production en terpènes secrétés à la surface des feuilles des tabacs génétiquement modifiés en comparaison avec les plantes non modifiées.

(ii) d'étudier le comportement de ces plantes en termes de croissance et développement en fonction de paramètres agronomiques (irrigation et densité de culture)

### **F.2 Date et durée prévue de l'opération.**

La présente demande est pour une période de trois (3) campagnes de culture d'avril 2006 à octobre 2008.

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

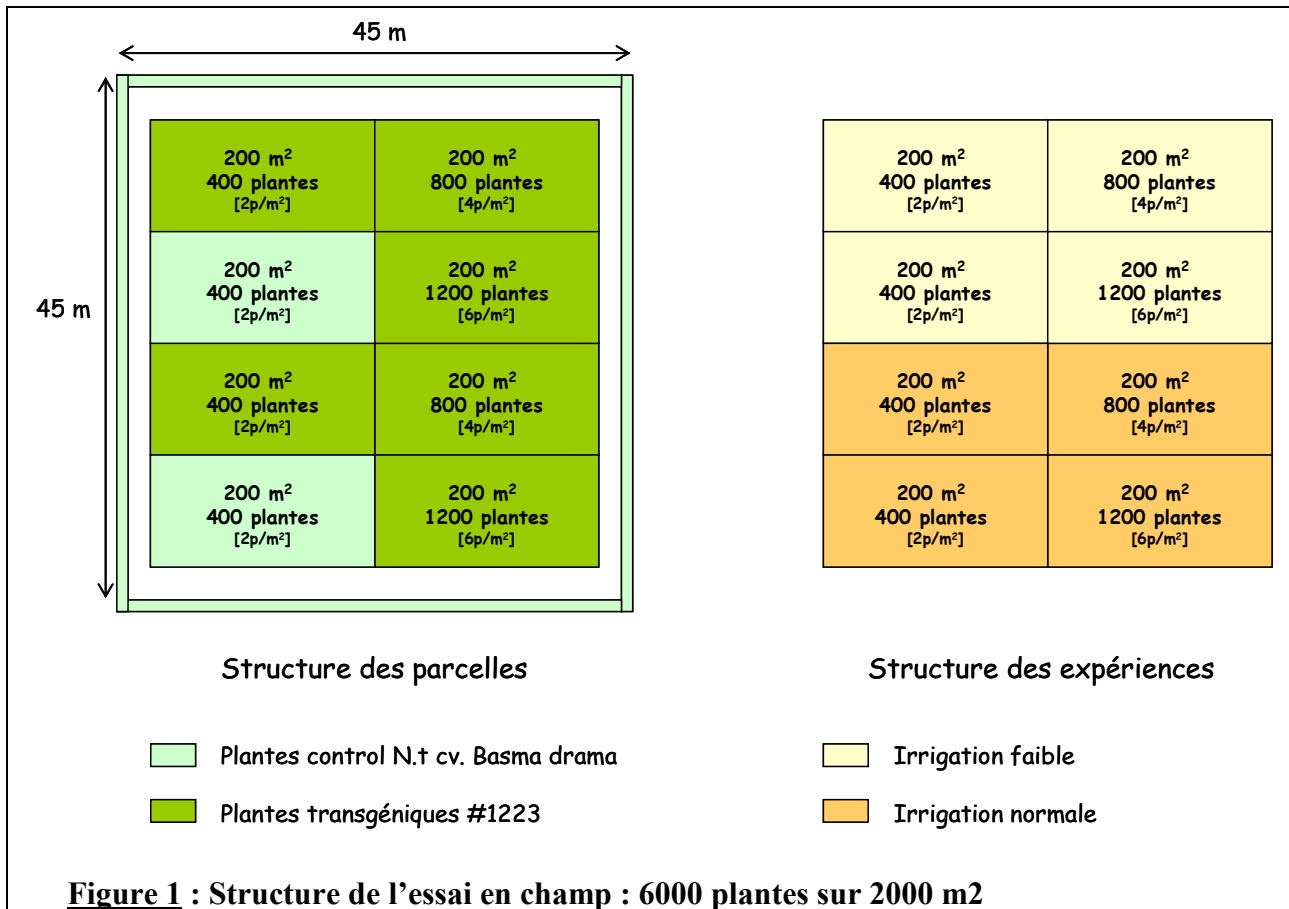
Les semis sont réalisés en serre, puis la plantation mécanique des jeunes plantes au champ s'effectue en mini-mottes.

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

Les cultures seront conduites selon la pratique agronomique recommandée pour le tabac. Dès que les premiers boutons floraux seront visibles, c'est-à-dire avant que les fleurs soient matures et puissent libérer leur pollen, les plantes seront coupées à mi-hauteur et récoltées pour être analysées. Afin d'évaluer la possibilité de faire une deuxième récolte, les plantes coupées une première fois seront maintenues en culture jusqu'à la seconde récolte avant l'éclosion des bourgeons floraux. L'écimage sera réalisé systématiquement dès l'apparition ponctuelle de bourgeons floraux, si ceci devait intervenir avant la récolte et la destruction du matériel. Le sol et les résidus végétaux seront traités par passage au rotavator. Un suivi du site et un contrôle d'éventuelles repousses seront réalisés au cours de l'année suivant l'expérimentation.

#### F.5 Nombre approximatif de plantes :

Chaque essai comprendra environ 6000 plantes au total sur une surface d'environ 2000 m<sup>2</sup>: 4800 plantes génétiquement modifiées, et 1200 plantes témoins non-modifiées. La structure de l'essai est présentée sur la figure 1.



## **G. MESURES DE PREVENTION DE DISPERSION**

### **G.1 Précautions prises**

G.1.a Distance(s) des autres espèces végétales sexuellement compatibles, espèces parentales sauvages et cultivées ;

La parcelle d'essai sera située à une distance d'au moins 500 (cinq cents) mètres de toute autre exploitation agricole pratiquant la culture du tabac. Le risque de dissémination incontrôlé est toutefois très faible car les plantes seront récoltées et détruites avant floraison (voir §F.4). Un suivi régulier des essais sera réalisé par un personnel compétent et informé du risque potentiel que représente la dissémination du pollen et des graines.

G.1.b Mesures visant à minimiser ou à empêcher la dissémination de tout organe reproducteur de la PSGM (par exemple pollen, graines, tubercules).

Les plantes seront récoltées avant la floraison à savoir avant la formation du pollen, aucune dissémination par le pollen n'est donc possible (voir §F.4).

### **G.2 Description des méthodes de traitement du site après dissémination**

Un suivi du site et un contrôle d'éventuelles repousses sur les parcelles d'essai seront réalisés au cours de l'année suivant l'expérimentation.

### **G.3 Description des méthodes de traitement après dissémination pour le matériel issu de plantes génétiquement modifiées, y compris les déchets**

Les tabacs ainsi que les résidus végétaux seront détruits par passage au rotavator sur le site de culture, le matériel végétal en résultant n'étant pas susceptible de produire à nouveau des plantes.

### **G.4 Description des plans et techniques de surveillance**

Le personnel mettant en place les essais sera informé des consignes de sécurité à respecter et des précautions à prendre en cours de culture concernant l'élimination des déchets végétaux (voir notice jointe). Les règles énoncées dans le guide de bonnes pratiques de recherche et «d'essai aux champs» publié par l'AFNOR (Réf. NFX42-071, Déc. 92) seront respectées. A l'approche de la floraison, les tabacs seront surveillés régulièrement et écimés en cas de besoin.

### **G.5 Description des plans d'urgence**

En cas de problème imprévu, tels qu'une destruction par la grêle ou une tempête, ou encore une attaque par une maladie l'expérimentation pourrait être détruite à tout moment par passage au rotavator.

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

Les PSGM de l'essai seront entourées d'une rangée de plantes témoins non-transgéniques de la même variété.

## **H. INFORMATIONS SUR LES EVENTUELLES INCIDENCES DE LA DISSEMINATION SUR L'ENVIRONNEMENT**

Ce paragraphe est un complément d'information à la notification conformément à l'annexe II D2 de la directive 2001/18/CE du parlement Européen et du conseil du 12 mars 2001 relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement et abrogeant la directive 90/220/CEE du conseil.

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

Deux raisons principales permettent de dire que les PSGM ne peuvent devenir plus persistantes dans les habitats agricoles. Premièrement, les variétés de tabac utilisées ne se développent pas spontanément dans l'environnement, les plantes sont sensibles au gel et sont uniquement des plantes cultivées. L'introduction du transgène ne modifie pas cette caractéristique. Deuxièmement, le gène introduit permet une diminution de la production en cembranes, molécules potentiellement impliquées dans la résistance aux insectes et aux pathogènes ce qui pourrait au pire rendre la PSGM plus susceptible à ceux-ci.

### **H.2 Avantages ou inconvénients sélectifs conférés aux PSGM**

Les PSGM proposées présentent une résistance à un antibiotique, l'hygromycine. En conditions naturelles, cette caractéristique n'est toutefois pas susceptible de procurer un avantage sélectif par rapport à la plante d'origine.

### **H.3 Possibilité de transfert de gènes aux mêmes espèces ou à d'autres espèces végétales sexuellement compatibles dans les conditions de plantation du PSGM et avantages ou inconvénients sélectifs conférés à ces espèces végétales.**

Le tabac (*N. tabacum*) est principalement une plante autogame, toutefois le risque de fécondation croisée avec des cultures commerciales de tabac existe (cf § B.4). Cependant, le risque de fécondation croisée avec d'autres espèces du genre *Nicotiana*, est dans le cas présent nul étant donné que les plantes seront éliminées avant la floraison (§ F.4). La seule espèce concernée est *Nicotiana tabacum*, puisqu'il s'agit de la seule espèce cultivée et que les autres espèces de *Nicotiana* (ex : *Nicotiana sylvestris*) ne poussent pas naturellement en France et ne sont pas cultivées.

En l'absence de possibilité de croisement avec des espèces végétales endogènes (cf. § D.6.c), les gènes introduits ne sont pas susceptibles de conférer un avantage sélectif aux espèces végétales sexuellement compatibles.

### **H.4 Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les PSGM et les organismes cibles, tels que prédateurs, parasitoïdes et agents pathogènes peuvent avoir sur l'environnement (le cas échéant).**

Aucune incidence n'est prévue, compte tenu des informations fournies précédemment.

**H.5 Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre le PSGM et des organismes non-cibles (compte tenu également des interactions d'organismes avec les organismes cibles), notamment les incidences sur les niveaux de population des concurrents, herbivores, symbiotes (le cas échéant), parasites et agents pathogènes.**

Les interactions de ces lignées avec des organismes non-cibles peuvent être considérés comme identiques à celles des tabacs cultivés.

**H.6 Effets immédiats et/ou différés éventuels sur la santé humaine résultants des interactions directes ou indirectes potentielles entre les PSGM et les personnes travaillant ou entrant en contact avec la ou les PSGM disséminées ou se trouvant à proximité.**

Dans la mesure où le phénotype des PSGM est une altération de la production en terpènes de la plante, composés naturellement produits par la plante sauvage, le risque pour les personnes travaillant sur ces cultures n'est pas différent du risque existant avec des cultures de tabac cultivé non modifié. Il s'agit en effet d'une variation quantitative (diminution des cembranes) et non qualitative (pas de nouveau composé présent).

Par ailleurs, le transgène introduit ne produit pas de protéine. Il a pour effet de diminuer l'expression d'une protéine endogène. La conséquence pour la plante est une diminution de la production en molécule de type cembrane. Il n'y a donc aucun risque d'effet toxique sachant que les différentes variétés de tabac produisent des taux très variables de cembrane.

La protéine hygromycine phosphotransférase qui confère la résistance à l'antibiotique hygromycine est produite dans toute la plante. Il n'est pas connu de phénomène toxique ou allergisant en dehors de son activité de résistance à un antibiotique à des concentrations élevées.

**H.7 Effets immédiats et/ou différés éventuels sur la santé des animaux et conséquences pour la chaîne alimentaire résultant de la consommation de l'OGM ou de tout produit dérivé s'il est destiné à être utilisé en tant qu'aliment pour animaux.**

Cette PSGM n'est pas destinée à l'alimentation des animaux.

**H.8 Incidences immédiates et/ou différées sur les processus biogéochimiques résultant des interactions directes et indirectes potentielles de l'OGM et des organismes cibles et non-cibles à proximité du ou des OGM disséminés.**

Aucune interaction n'est à ce jour connue entre l'OGM et des processus biogéochimiques.

**H.9 Incidences immédiates et/ou différées, directes ou indirectes, que les techniques spécifiques de culture, de gestion et de récolte utilisées pour le PSGM peuvent avoir sur l'environnement lorsqu'elles sont différentes de celles utilisées pour des plantes supérieures non génétiquement modifiées**

Il n'y a pas de techniques spécifiques de culture appliquées à la PSGM dans cette demande.

## REFERENCES

- Delon R., 1993 « Le tabac » dans Méthodes traditionnelles de sélection des plantes. Document OCDE
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT. (1985) Simple and general-method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231.
- Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM. (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*. 407 :319-20
- Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:13959-64
- Wang E, Wang R, Deparasis J, Loughrin JH, Gan S, Wagner GJ. (2001). Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. *Nature Biotechnology* 19: 371-374.
- Wang E, Wagner GJ. (2002). Elucidation of the functions of central to diterpene metabolism in tobacco trichomes using posttranscriptional gene silencing. *Planta* 216:686-691
- Wagner GJ, Wang Z, Shepherd RW (2004) New Approaches for Studying and Exploiting an Old Protuberance, the Plant Trichome *Annals of Botany* 93(1): 3-11.