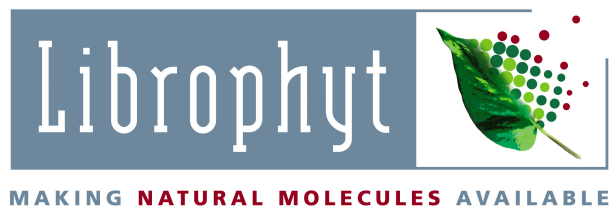


Demande d'autorisation auprès de la Commission d'Etude de la
Dissémination des Produits issus du Génie Biomoléculaire

Essai au champ pluriannuel de *Nicotiana sylvestris* produisant un taxoïde.

Dossier Scientifique et Technique

Présenté par la société LIBROPHYT le 8 novembre 2006.



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 de culture en champ de tabac génétiquement modifié qui doit permettre la production d'au moins 20 grammes d'un nouveau taxoïde. Il s'agit d'un premier essai en champ pour les événements de transformation qui permettent cette production; il fait suite à de nombreuses expérimentations en milieu confiné (chambre phytotronique). Il permettra d'évaluer, dans des conditions agronomiques normales, le niveau de production du taxoïde par les feuilles du tabac génétiquement modifié. Cette production a pour but ultime l'extraction et la purification de ce taxoïde pour une étude pharmacologique ultérieure.

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 et la stabilité d'expression des caractères introduits dans les plantes a été observée durant plusieurs générations en chambre phytotronique.

Tables des matières:

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	11
D. INFORMATIONS CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE.....	13
E. INFORMATION CONCERNANT LE SITE DE DISSÉMINATION	16
F. INFORMATIONS CONCERNANT LA DISSEMINATION	18
G. MESURES DE PREVENTION DE DISPERSION	19
H. INFORMATIONS SUR LES EVENTUELLES INCIDENCES DE LA DISSEMINATION SUR L'ENVIRONNEMENT	20
I. REFERENCES	22

RESUME DES POINTS PRINCIPAUX

- Notifiant : Librophyt SAS.
- Titre : Demande d'essai au champ pluriannuel de *Nicotiana sylvestris* produisant un nouveau taxoïde.
- Objectif de la transformation : assurer la production d'un nouveau taxoïde par les trichomes glandulaires des feuilles de *Nicotiana sylvestris*.
- Espèce végétale réceptrice : *Nicotiana sylvestris*.
- Gènes d'intérêt introduits et séquences de contrôle : fragment d'un gène de tabac et ADNc de deux gènes d'if (*Taxus spp.*), sous le contrôle de promoteurs spécifiques des trichomes.
- 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 de *Nicotiana sylvestris*, d'avril 2007 à octobre 2009.
- Localisation probable des disséminations : Allemanche (Marne)
- Précautions envisagées : écimage des tabacs avant floraison, destruction par broyage des résidus de culture à la fin de la récolte, suivi régulier d'éventuelles repousses l'année suivant l'expérimentation.
- Résumé des expériences antérieures : il n'y a pas d'expériences antérieures avec ces transformants.
- Objectif de l'essai : évaluer la production d'un taxoïde dans l'exsudat des feuilles de *Nicotiana sylvestris* dans des conditions de plein champ.
- Nombre et surface des essais : 1 essai de 40 000 plantes sur une surface de 10 000 m² /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 micro-organismes 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, ou encore 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 le Taxol® (figure 1), un diterpène extrait de l'if, qui est utilisé en chimiothérapie dans les traitements contre certains types de cancer et l'artémisinine, un sesquiterpène extrait de l'armoise annuelle, utilisé dans le traitement du paludisme.

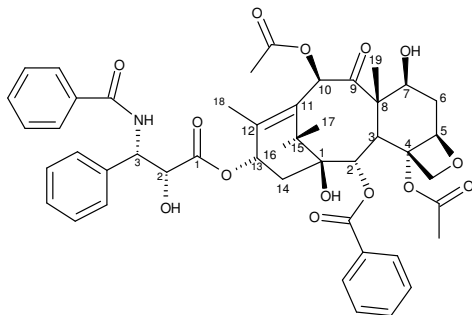


Figure 1 : Taxol

Cependant, le coût de production de ces molécules est parfois très élevé en raison de la difficulté de les synthétiser par voie chimique, de leur faible concentration dans la plante, et de la raréfaction de la plante source.

Librophyt

Librophyt est une jeune société de biotechnologie qui propose des solutions alternatives pour produire des terpènes d'intérêts par du tabac génétiquement modifié, et pour en diminuer les coûts de production. Produire ces molécules dans le tabac permettra de protéger les espèces sauvages menacées à partir desquelles elles sont traditionnellement extraites.

La stratégie de Librophyt repose sur l'utilisation des trichomes de tabac comme usine cellulaire de production.

Les trichomes

Les feuilles de tabac possèdent à leur surface des structures spécialisées dénommées trichomes. Ceux-ci sont divisés en trichomes simples, hydathodes et trichomes sécréteurs. Chez l'espèce de tabac sauvage *Nicotiana sylvestris*, les trichomes de type sécréteurs sont responsables de la production de diterpènes de la classe des cembranes. Les cembranes de *N. sylvestris* comprennent principalement l' α - et le β -cembratrienediol (CBT-diols). Ces molécules sont synthétisées dans les cellules glandulaires situées à la tête du trichome sécréteur 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.

Voie de biosynthèse des terpènes cycliques

Les voies de biosynthèse des terpènes ont été abondamment décrites 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 d'une unité d'IPP à un DMAPP produit du géranyl diphosphate (GPP, C10), puis celle d'IPP à du GPP produira du farnésyl diphosphate (FPP, C15) et enfin l'addition d'IPP à du FPP produira du géranyl géranyl diphosphate (GGPP, C20). Ces chaînes de prényl diphosphates de longueur variable sont les substrats d'une classe d'enzyme, les terpènes synthases qui permettent la formation du squelette de base des terpènes cycliques en C10 (monoterpène), C15 (sesquiterpène), C20 (diterpène), ou 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, ou 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 (figure 1).

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 (figure 2) 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.

Extinction de la voie du CBT-diol

La société Librophyt a démontré la possibilité d'éteindre la voie du CBT-diol par le développement de lignées transgéniques exprimant un ARN double brin de gène CBTS (brevet n° FR 0410799, 2004). Les lignées nommées ihpCBTS, ainsi obtenues, ne produisent que des quantités résiduelles de CBT-diol (de l'ordre du %). Cette approche permet de rendre disponible le GGPP pour la synthèse d'autres molécules (figure 2).

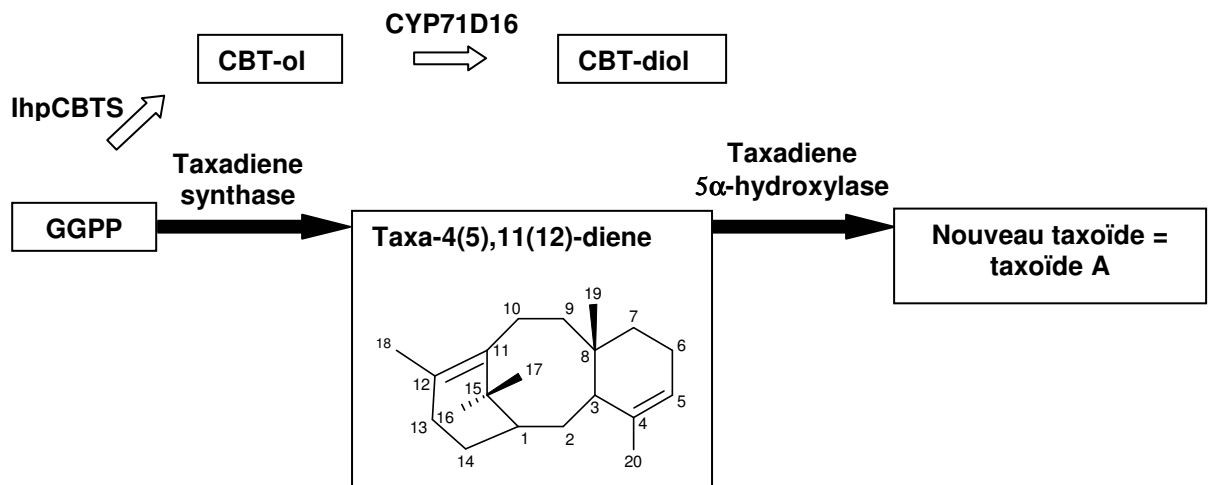


Figure 2: Voie de biosynthèse d'un taxoïde dans les plantes NsTax.

Voie hachurée: la synthèse de CBT-diol est fortement réduite du fait de l'expression de ihpCBTS. Voie en gras : le GGPP est utilisé pour la synthèse de taxa-4(5),11(12)-diène, intermédiaire vers un nouveau taxoïde, le taxoïde A.

Production d'un nouveau taxoïde

Dans une lignée de type ihpCBTS, deux gènes de l'if codant pour des enzymes de la voie du taxol ont été introduits. Il s'agit de la taxadiène synthase (Wildung et Croteau, 1996) et de la taxadiène 5 α -hydroxylase (Jennewein et al., 2004). La nouvelle voie métabolique se branche sur le pool de GGPP disponible, par la taxadiène synthase (figure 2). Celle-ci assure la production de taxa-4(5),11(12)-diène, qui sera intégralement converti par la taxadiène 5 α -hydroxylase en un nouveau taxoïde (taxoïde A ; sa structure exacte est indiquée dans l'annexe confidentielle). La lignée de *N. sylvestris* produisant ce taxoïde est appelée NsTax. La lignée NsTax a donc intégré dans son génome trois transgènes. Chaque transgène est sous le contrôle de promoteurs spécifiques des trichomes sécréteurs de type CBTS (brevet FR 0410799, 2004). Le nouveau taxoïde devient donc un des constituants de l'exsudat présent à la surface des feuilles des plantes de la lignée NsTax.

Objectifs de l'essai en champ

La culture en champ de NsTax a pour but la production d'au moins 20 grammes du taxoïde A. Plus précisément, dans des conditions normales de culture, cet essai permettra :

- d'évaluer la teneur en taxoïde A sécrété dans l'exsudat.
- d'étudier le comportement de ces plantes en termes de croissance et de développement par rapport à des plantes sauvages.
- de récolter le champ de tabac pour extraire le taxoïde A et de produire environ 50 à 100 g du taxoïde A. Ces quantités serviront à réaliser des tests pharmacologiques et toxicologiques et de créer des dérivés par hémisynthèse pour la recherche de nouveaux candidats médicaments.
- de réaliser une étude de l'impact éventuel sur l'environnement de la culture de cette lignée.

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 (1993), Université d'Orsay. Habilitation à diriger des recherches (2001).

- Docteur en Sciences Biologiques et Médicales (2000). Université Victor Segalen Bordeaux 2.

A.3 Titre du projet

Dossier de demande d'avis pour des essais pluriannuels de *Nicotiana sylvestris* produisant un taxoïde.

A.4 Développements ultérieurs envisagés

Cette expérimentation au champ s'inscrit dans un programme de production de divers taxoïdes destinés à des tests pharmacologiques.

B. INFORMATIONS CONCERNANTS LES PLANTES RECEPTRICES

B.1 Nom complet

B.1.a Nom de famille: Solanacées

B.1.b Genre: *Nicotiana*

B.1.c Espèce: *sylvestris*

B.1.d Sous-espèce: non applicable

B.1.e Cultivar / lignée: non applicable

B.1.f Nom usuel: Tabac sylvatique

B.2 Information concernant la reproduction

B.2.a Information concernant la reproduction

Le tabac sylvatique a un comportement en tous points proche du tabac cultivé.

i) Mode de reproduction

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

ii) Facteurs spécifiques affectant la reproduction

La fleur de tabac sylvatique est hermaphrodite, la pollinisation se fait quasi exclusivement par auto pollinisation sans intervention humaine.

iii) Temps de génération

Le tabac sylvatique 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 :

Le tabac sylvatique est une espèce sauvage originaire d'Amérique du Sud et n'est pas une espèce cultivée en France, ni ailleurs dans le monde. Il n'existe pas d'espèces sauvages sexuellement compatibles en France. 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

Comme pour le tabac cultivé, les plants de tabac sylvatique ne se développent pas spontanément en plein champ sous nos latitudes. Un semis direct au champ est quasiment impossible du fait de la compétition avec les mauvaises herbes. La culture du tabac sylvatique 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 (cultivé comme sylvatique) 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

Nicotiana sylvestris (le tabac sylvatique) est originaire d'Amérique du Sud et n'existe pas à l'état sauvage en Europe. Il est utilisé occasionnellement et de façon très limitée (rond-points) comme plante ornementale en raison de sa taille et de ses grandes hampes florales.

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. Cependant, *Nicotiana sylvestris* n'existant ni à l'état cultivé ni à l'état sauvage en France, et les possibilités de croisement spontané avec le tabac cultivé étant quasiment nulles, les possibilités de dissémination par croisement sont extrêmement faibles.

B.5 Distribution géographique de la plante

Comme mentionné plus haut, le tabac sylvatique n'est pas cultivé et sa distribution géographique est donc essentiellement limitée à sa zone d'origine. Cependant, cette plante est utilisée dans nos pays comme ornementale et apparaît sporadiquement sur des parterres de fleurs (rond-point, jardins publics).

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 sylvatique est originaire d'Amérique du Sud, plus particulièrement d'Argentine et de Colombie. En Argentine, *Nicotiana sylvestris* est localisé dans les forêts tropicales du nord-est du pays, dans la zone piedmontaise de la chaîne andine (Province du Tucuman, région de Las Yungas) à des altitudes situées entre 300 et 600 m (<http://www.mineria.gov.ar/ambiente/estudios/IRN/tucuman/t-5.asp#42>).

ii)Prédateurs naturels, concurrents et symbiotes

Comme toutes les plantes, le tabac (sylvatique ou cultivé) 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 entrer 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. La culture de NsTax conduit à la production d'un nouveau taxoïde, qui n'est pas présent naturellement dans le tabac. Cette molécule peut présenter un risque de toxicité pour tout organisme vivant entrant en contact avec les lignées NsTax (la toxicité éventuelle de ce nouveau taxoïde est discutée en D.7). Il est important de noter qu'en revanche, ce taxoïde n'est pas volatile aux températures ambiantes ce qui limite l'interaction avec cette molécule uniquement au mode du contact.

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.

C.2 Nature et source du vecteur utilisé

Les vecteurs binaires pLIBRO_16, pLIBRO_17, et pLIBRO_09 portant la taxadiène synthase, la taxadiène 5 α -hydroxylase, et le ihpCBTS respectivement, ont été introduits séparément par électroporation dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Les transformations ont été réalisées sur *N. sylvestris* par inoculation de disques foliaires selon le protocole de Horsch et al., (1985) avec la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 contenant les plasmides binaires mentionnés ci-dessus. Les transformants ayant intégré une copie du T-DNA, ont été sélectionnés et croisés de façon à réunir les trois transgènes dans la même plante. Le pedigree complet de la lignée NsTax comportant les trois transgènes est indiqué figure 3.

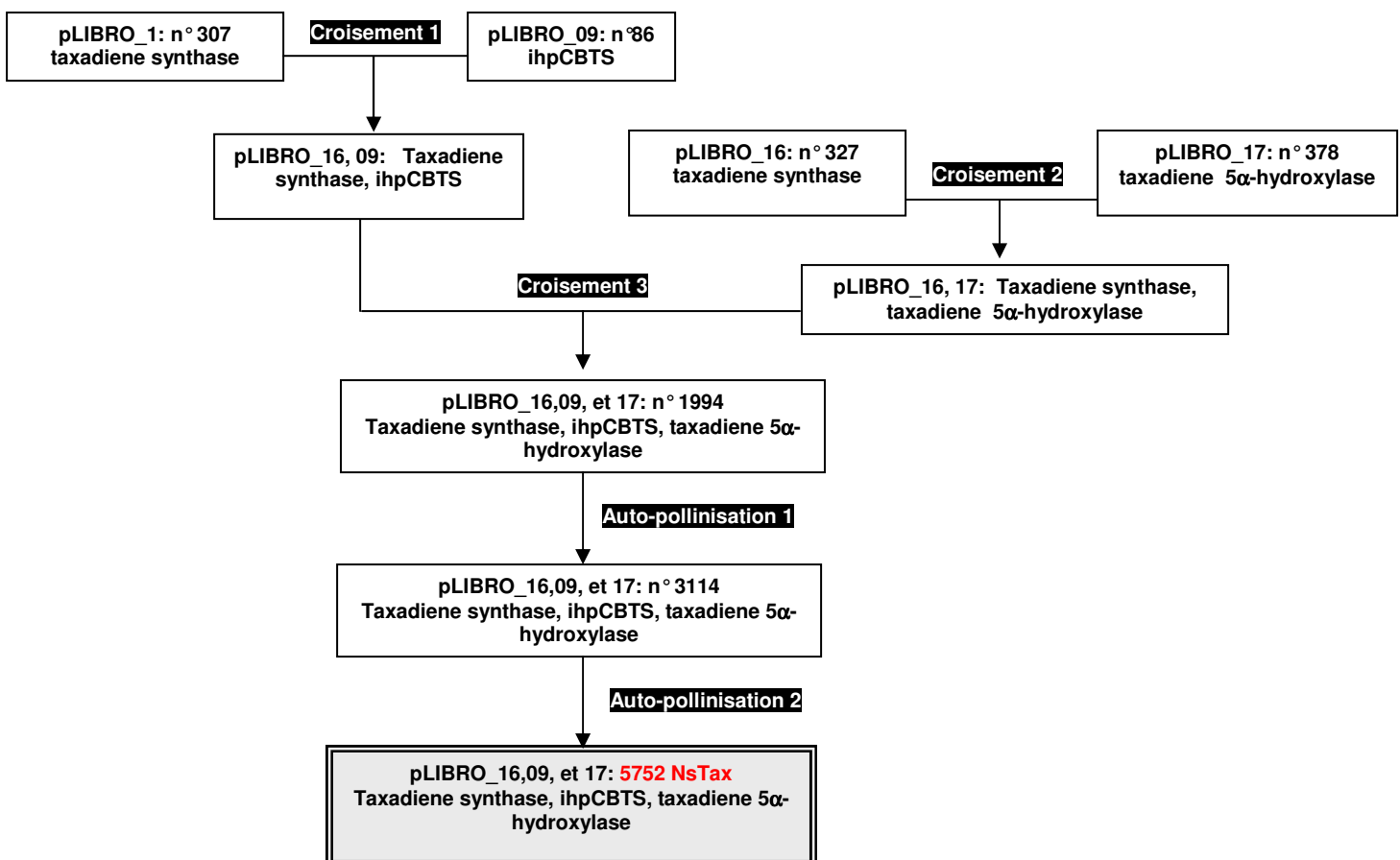


Figure 3: Pedigree de 5752 NsTax. Obtention des plantes 5752 NsTax par croisement des simples transformants taxadiene synthase, taxadiene 5 α -hydroxylase, ihpCBTS.

Les plasmides binaires pLIBRO_09, 16 et 17, contenant les transgènes ont été utilisés pour obtenir l'évènement de transformation qui fait l'objet de ce dossier. Ils sont dérivés 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 ARN double brin correspondant à un fragment du gène CBTS 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).
- un ARN codant pour la protéine taxadiène synthase. L'introduction de cette enzyme conduit à la production d'un intermédiaire métabolique qui est la taxa-4(5),11(12)-diène. Cette molécule dans le cadre des lignées NsTax est cependant absente car il s'agit d'un intermédiaire métabolique qui ne s'accumule pas et est substrat de la taxadiène 5 α -hydroxylase.
- un ARN codant pour la protéine taxadiène 5 α -hydroxylase. Cette enzyme consomme toute la taxa-4(5),11(12)-diène produite, pour accumuler le taxoïde A: produit final de la voie recombinante (figure 2).
- l'hygromycine phosphotransférase dans les tissus où s'exprime le promoteur ubiquitaire CaMV 35S.

D.2 Informations sur les séquences réellement transférées

La lignée NsTax portant les trois 3 T-DNA des plasmides pLIBRO_09, 16 et 17 a été sélectionnée pour 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 lignée NsTax 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 du caractère confidentiel de ces informations.

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

Les informations détaillées concernant l'expression des inserts 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 du caractère confidentiel de ces informations.

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 chambre phytotronique (milieu confiné) ainsi que la vitesse de reproduction, ne sont pas modifiés par l'introduction des inserts dans les plantes étudiées par rapport à la plante sauvage.

D.4.b Dissémination

Aucune altération de la fertilité des plantes modifiées NsTax 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 milieu confiné 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 présence des trois transgènes étant présent sur les trois dernières générations (figure 3), il s'agit donc d'intégration stable et transmissible.

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

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.a Transfert interspécifique ou intergénérique

La seule espèce vers laquelle le transfert pourrait se produire est le tabac cultivé, *Nicotiana tabacum*. Cependant, il faut souligner que ce transfert est hautement improbable pour plusieurs raisons. Premièrement, la fréquence spontanée de croisement entre ces deux espèces est quasi impossible en conditions naturelles, sans une intervention humaine. De plus, les hybrides interspécifiques entre une espèce amphidiploïde (*N. tabacum*) et diploïde (*N. sylvestris*) sont stériles et rarement viables, limitant considérablement le risque de dissémination

D.6.b Transfert intraspécifique

Cette hypothèse est purement théorique puisque l'espèce *Nicotiana sylvestris* n'est présente ni à l'état sauvage ni à l'état cultivé en France. De plus, dans cette expérience, les plants de tabac seront récoltés avant la formation de pollen mature. En conclusion, il est donc impossible que ces plantes transgéniques se croisent avec d'autres tabacs de la même espèce.

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 ultérieure, la PSGM n'est pas destinée à l'alimentation humaine ou animale. Cette PSGM est utilisée pour la production d'un taxoïde A comme nouveau précurseur de molécules à visée pharmaceutique.

Le taxoïde A produit par NsTax est une molécule récemment produite et identifiée par le programme de R&D de la société Librophyt. A ce jour, il n'existe aucun autre moyen de production de ce taxoïde que la lignée NsTax. Cet essai a précisément pour but de le produire en quantité suffisante pour tester son activité ainsi que celle de dérivés produits par hémisynthèse sur des cibles biologiques.

Bien que le taxoïde A soit de la même famille chimique que le Taxol, le Taxotere ou d'autres taxanes toxiques produits par l'if, il est fort peu probable que le taxoïde A soit doté des mêmes propriétés. En effet, il a été démontré que l'activité anti-mitotique du Taxol et du Taxotere est due à la présence de fonctionnalités chimiques sur le squelette de base de type taxane que ne possède pas le taxoïde A. Citons notamment le noyau oxétane, la chaîne latérale liée au C13, ou encore le noyau benzoate sur le C2 (Combeau *et al.* (1994), Lataste *et al.* (1984), Gabetta *et al.* (1999). Les autres taxanes toxiques

produits par l'if sont également hautement fonctionnalisés et la simplicité relative du taxoïde A par rapport aux taxanes présents dans l'if, suggère qu'il ne possède aucune des activités toxiques de ces taxanes. Cela dit, quelques comparaisons d'ordre quantitatif par rapport au taxol peuvent permettre de mieux appréhender le risque de toxicité. La dose létale 50 (DL50) du taxol sur la souris est de 20 mg/Kg (Kim et al., 2001). Or, la quantité du taxoïde A à la surface des feuilles de NsTax en milieu confiné est de $1 \pm 0,2$ mg par Kg de feuille fraîche. Une plante adulte approche 200 g. Il faudrait donc la production de 100 plantes réunies et concentrée dans un faible volume pour atteindre la valeur équivalente de la DL50 du taxol sur la souris. Or nous savons que le taxoïde A ne possède pas les modifications qui permettent au taxol d'être actif à de si faibles doses. Par conséquent, la toxicité des lignées NsTax peut donc être considérée comme faible pour des mammifères entrant en contact avec les plantes NsTax.

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 au niveau du champ d'exploitation.

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

Il y a un risque de toxicité non évalué du nouveau taxoïde sur des organismes non cibles pathogènes ou non qui interagissent avec les plants de *Nicotiana sylvestris*. Cependant, comme souligné plus haut, la concentration de ce taxoïde A dans les plantes est faible et le risque de toxicité est globalement considéré comme faible.

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 deux manières.

- L'analyse génomique des plantes par PCR. 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 par PCR sera réalisée avec les amorces spécifiques des transgènes. Le séquençage du fragment d'ADN amplifié, permettra de confirmer sans ambiguïté si la plante correspond à la lignée NsTax.
- L'analyse GC-MS (chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse) de l'exsudat permet d'identifier la présence du nouveau taxoïde.

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

E.1 Localisation et étendue des sites de dissémination

Le site choisi est une parcelle de 10 000 m² sur la commune D'ALLEMANCHE dans le département de la Marne (51). ALLEMANCHE appartient au canton d'ANGLURE, qui en est le chef-lieu. ALLEMANCHE est limitrophe d'ANGLURE. ALLEMANCHE étant une très petite commune, les informations recensées ci-dessous sont celles relatives au canton d'ANGLURE.

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

ALLEMANCHE est une commune rurale de 115 habitants située au sud-ouest du département de la Marne. ANGLURE est le siège de la communauté de communes du pays d'Anglure (<http://www.cc-pays-anglure.com/interm.htm>), à laquelle appartient ALLEMANCHE.

L'agriculture est une des principales richesses du secteur. Si les céréales restent les cultures dominantes en occupant 50% de la Surface Agricole Utile (SAU), les cultures légumières sur de grandes surfaces sont de plus en plus fréquentes. L'activité est fondée sur de nombreuses fermes céréalières, des plantations diverses (pommes de terre, poireaux....).

La plus grosse sucrerie d'Europe est implantée à 18 km d'ANGLURE. Le vignoble d'appellation "Champagne" est présent sur certaines communes de la Communauté avec près d'une centaine d'hectares sur la seule commune de LA CELLE-SOUS-CHANTEMERLE.

Climat : le canton d'Anglure est situé à 130 km à l'est de Paris à une altitude de 75 m. Le climat de la Marne est un climat océanique de transition. La légère continentalisation se caractérise par des pluies convectives estivales et une amplitude thermique annuelle dépassant 15°C. La répartition moyenne des précipitations en cours d'année est relativement homogène. La quantité de pluie moyenne annuelle est autour de 500mm dans la plaine de Reims à Châlons en Champagne. Le caractère bref et intense des épisodes pluvieux estivaux apparaît nettement si l'on rapporte la hauteur des pluies à leur durée (à Reims : 49mm en 40h en moyenne au mois d'Août, 44mm en 108h au mois de Janvier). Le nombre de jours de précipitations supérieures à 1 mm varie de 110 à 150 jours par an, et de 14 à 34 jours pour un seuil de 10mm.

La température moyenne annuelle est voisine de 10°C sur l'ensemble du département. En hiver, le nombre moyen de jours avec une température inférieure à 0°C est de 60. L'été est relativement contrasté avec une moyenne de 43 jours où la température dépasse 25°C sous abri.

La durée d'insolation totale annuelle est de 1724 heures. Elle varie du simple au triple entre les 62h de moyenne mensuelle en hiver et les 225h estivales.

Les vents dominants, de secteur Sud-Ouest, sont généralement modérés.

Faune et flore :

Une description détaillée de la faune et de la flore est disponible sur le site de l'Inventaire National du Patrimoine Naturel (<http://inpn.mnhn.fr/>), ainsi que la liste des espèces protégées sur le département de la Marne.

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

Il n'existe aucune espèce sauvage sexuellement compatible. Quant au tabac cultivé, les probabilités de croisement spontané par du pollen de *Nicotiana sylvestris* sont extrêmement faibles d'une part parce que les plantes seront écimées avant la maturation du pollen, d'autre part parce que les fréquences de croisement spontané entre *N. sylvestris* et *N. tabacum* sont très faibles.

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

La carte des sites protégés de la région Champagne-Ardennes est disponible sur le site :

http://www.champagne-ardenne.ecologie.gouv.fr/milieus_naturels/mil_nat.htm.

Par ailleurs la liste des sites protégés sur la commune d'Anglure est la suivante :

ZNIEFF 2 (Zones Naturelles d'Intérêt Ecologique, Faunistique et Floristique) : BASSE VALLEE DE L'AUBE DE MAGNICOURT A SARON-SUR-AUBE (FR210000988)

ZNIEFF 1 : BOIS ET MARAIS DU RU DE CHOISEL AU NORD D'ANGLURE (FR210009505)

ZICO (Zones Importantes pour la Conservation des Oiseaux): VALLEE DE L'AUBE, DE LA SUPERBE ET MARIIGNY (CA07).

F. INFORMATIONS CONCERNANT LA DISSEMINATION

F.1 Objectif de la dissémination

Cette dissémination dans des conditions de plein champ a pour objectif :

- d'évaluer la teneur en taxoïde A sécrété dans l'exsudat.
- d'étudier le comportement de ces plantes en termes de croissance et de développement par rapport à des plantes sauvages.
- de récolter le champ de tabac pour extraire le taxoïde A et de produire environ 50 à 100 g du taxoïde A. Ces quantités serviront à réaliser des tests pharmacologiques et toxicologiques et à créer des dérivés par hémisynthèse pour la recherche de nouveaux candidats médicaments.
- de réaliser une étude de l'impact éventuel sur l'environnement de la culture de cette lignée.

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

La présente demande est pour une période de trois 3 campagnes de culture d'avril 2007 à octobre 2009.

F.3 Méthode de dissémination envisagée.

Les semis seront réalisés en serre, puis la plantation mécanique des jeunes plantes au champ s'effectuera 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 cultivé. 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. Après récolte, le sol et les résidus végétaux seront traités par passage au rotavator. Un suivi du site en terme de contamination des sols par le nouveau taxoïde, et un contrôle d'éventuelles repousses seront réalisés au cours de l'année suivant l'expérimentation.

F.5 Nombre approximatif de plantes :

L'essai comprendra environ 40 000 plantes au total sur une surface d'environ 10 000 m²: 39 000 plantes génétiquement modifiées, et 1 000 plantes témoins non-modifiées.

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 (cf. F.4). Un suivi régulier des essais sera réalisé par un personnel compétent et informé du risque potentiel que représente la dissémination du pollen, des graines, et de la possible toxicité du toxoïde sécrété par les feuilles..

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 (cf. F.4). De plus, *Nicotiana sylvestris* est une espèce sexuellement incompatible avec *Nicotiana tabacum* (tabac cultivé) dans les conditions naturelles.

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. Un dosage de la contamination de sols par le nouveau toxoïde sera réalisée et si nécessaire la demi-vie de la molécule sera déterminée.

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. Le personnel intervenant sur la culture sera informé de l'obligation d'utiliser des gants et de porter une blouse pour prévenir tout contact de la peau (bras ou jambes) avec les plantes.

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 espèce.

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.

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 des transgènes ne modifie pas cette caractéristique.

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 sylvatique (*N. sylvestris*) est une plante autogame, toutefois le risque de fécondation croisée avec des cultures commerciales de tabac n'existe pas car *N. sylvestris* ne pousse pas naturellement en France et n'est pas cultivée.

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).

Il n'y a pas d'organisme cible dans cet essai.

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.

La toxicité éventuelle du nouveau taxoïde sur des organismes prédateurs de type insectes n'a pas été évaluée (voir D.7). Cependant de nombreux insectes sont déjà naturellement victimes de l'exsudat du tabac par un phénomène mécanique d'engluement dû à la nature collante de l'exsudat.

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.

La présence du nouveau taxoïde et son risque éventuel de toxicité sur la santé humaine, évalué comme faible (voir D.7), doit conduire les personnes travaillant sur le site à éviter tout contact direct la peau. A cet

effet, le port de gant en latex et de blouse pour les personnes qui auront à entrer dans le champ sera obligatoire. Le port de masque n'est pas requis du fait que le taxoïde produit n'est pas volatil.

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.

Le taxoïde A est produit uniquement dans les feuilles de la PSGM. Le taxoïde A ne devrait par conséquent pas se retrouver dans le sol. Le seul moyen par lequel il pourrait se retrouver dans le sol est par ruissellement depuis l'exsudat des feuilles. Cependant, le taxoïde A est une molécule très hydrophobe et donc les risques d'entraînement par ruissellement d'eau de pluie sont très faibles. En tout état de cause, une analyse des sols sera réalisée à la fin de la culture afin de détecter et quantifier le cas échéant le taxoïde A. Dans le cas où cette molécule serait détectée dans le sol, une analyse de sa demi-vie sera réalisée.

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. Cependant du fait du risque de la toxicité du nouveau taxoïde, le matériel agricole entrant en contact avec le champ de NsTax devra être lavé. Les eaux usées devront être traitées de la même manière que celles utilisées pour le rinçage de cuve de pesticides selon les normes en vigueur. En particulier si le taxoïde est recensé dans un bassin de décantation des eaux usées, un dosage sera réalisé à intervalle de temps approprié (en accord avec sa demi-vie) jusqu'à disparition du taxoïde.

I. REFERENCES

- Combeau C, Commercon A, Mioskowski C, Rousseau B, Aubert F, Goeldner M. (1994) Predominant labeling of beta- over alpha-tubulin from porcine brain by a photoactivatable taxoid derivative. *Biochemistry*. 33(21):6676-83
- Delon R., 1993 « Le tabac » dans Méthodes traditionnelles de sélection des plantes. Document OCDE
- Jennewein S, Long RM, Williams RM, Croteau R (2004). Cytochrome p450 taxadiene 5alpha-hydroxylase, a mechanistically unusual monooxygenase catalyzing the first oxygenation step of taxol biosynthesis. *Chem Biol*. 11(3):379-87.
- Gabetta B, Fuzzati N, Orsini P, Peterlongo F, Appendino G, Vander Velde DG (1999) Paclitaxel analogues from *Taxus x media* cv. *Hicksii*. *J Nat Prod*. 62(2):219-23.
- 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.
- Kim SC, Kim DW, Shim YH, Bang JS, Oh HS, Wan Kim S, Seo MH. (2001) In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. *J Control Release*. May 14;72(1-3):191-202.
- Lataste H, Senilh V, Wright M, Guenard D, Potier P. (1984) Relationships between the structures of taxol and baccatine III derivatives and their in vitro action on the disassembly of mammalian brain and *Physarum amoebal* microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81(13):4090-4
- 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 company* 93(1): 3-11.
- Wildung MR, CroteauR, (1996), A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *J Biol Chem* 9;271(16):9201-4