

# Comité scientifique

du

## Haut Conseil des biotechnologies

Paris, le 15 mars 2010

### Avis

sur le dossier **B/FR/09.11.01**

Le Comité scientifique (CS) du Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 3 février 2010 par les autorités compétentes françaises (la Direction générale de l'alimentation du Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche) d'une demande d'avis relative à une demande d'autorisation pour un essai d'une durée de quatre ans en champ de plantes génétiquement modifiées sous le titre : « Expérimentation en milieu non confiné de porte-greffes transgéniques de vigne exprimant le gène de la protéine de capsid du *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) ».

Ce dossier est déposé par l'**Inra**, dans le cadre de l'article R.533-8 du code de l'environnement sous la référence **B/FR/09.11.01**.

Le CS<sup>1</sup> a procédé à l'examen du dossier le 16 février 2010 sous la présidence de Jean-Christophe PAGES.

---

<sup>1</sup> La composition du Comité scientifique ainsi que les personnes extérieures ayant contribué à l'élaboration de l'avis sont indiquées dans l'Annexe 1.

## RESUME DE L'AVIS

La présente demande d'expérimentation en milieu non confiné porte sur la poursuite d'un essai initié il y a cinq ans. L'objectif est d'étudier des porte-greffes de vigne génétiquement modifiés pour exprimer le gène codant la protéine de capsid de la souche F13 du *Grapevine fanleaf virus* (GFLV). Ce virus, transmis par un nématode inféodé à la vigne et au figuier, est l'agent principal de la maladie du court-noué de la vigne. L'expression du transgène par le porte-greffe vise à induire une résistance de la plante greffée à la maladie du court-noué. Les porte-greffes expriment de plus une résistance à une famille d'antibiotiques (incluant la kanamycine) utilisée pour la sélection des cellules de vignes transformées. Les expérimentations antérieures ont permis de sélectionner trois lignées exhibant une résistance au court-noué.

Le nombre de pieds transgéniques déjà plantés depuis quatre ans s'élève à 70 ; il ne sera pas augmenté au cours de cet essai. Les pieds sont entourés d'une première bordure de plants de vignes non génétiquement modifiés, et d'une zone de jachère elle-même entourée d'une deuxième bordure de vignes non transgéniques. Une bâche de géotextile microporeux empêche la progression des racines — et donc la migration des nématodes — en profondeur et sur les côtés des parcelles transgéniques. L'ensemble de l'essai est entouré d'une barrière empêchant l'entrée de petits animaux.

Les greffons non transgéniques ne seront jamais conduits à fleurs, les déchets végétaux seront incinérés au fur et à mesure de leur collection. Au terme de l'expérimentation, l'ensemble du matériel végétal implanté sera détruit par dévitalisation, arrachage et incinération, et le terrain sera désinfecté.

Le site sera inspecté par les services du MAAP (Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et de la Pêche) selon les plans de surveillance proposés par le pétitionnaire et approuvés par le CS du HCB.

Dans l'état actuel des connaissances, compte tenu des caractéristiques des OGM disséminés, de la taille de l'expérimentation et des mesures préventives adaptées, le CS du HCB considère que l'expérimentation telle qu'elle est décrite dans le dossier **B/FR/09.11.01** ne présente pas de risques identifiables pour la santé humaine ou animale ou pour l'environnement. Le CS du HCB recommande que le suivi de l'essai selon les plans de surveillance spécifique et générale fasse l'objet d'un rapport annuel durant la période d'autorisation de l'essai et pendant 10 ans au-delà de l'essai.

## TABLE DES MATIERES

<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>4</b>
<b>2. OBJECTIFS DE L'ESSAI .....</b>	<b>4</b>
<b>3. CARACTERISTIQUES DES PLANTES GENETIQUEMENT MODIFIEES .....</b>	<b>5</b>
3.1 METHODE DE TRANSFORMATION .....	5
3.2 DESCRIPTION MOLECULAIRE ET GENETIQUE .....	5
- <i>Caractéristiques génétiques de la construction</i> .....	5
- <i>Caractéristiques génétiques des porte-greffes transgéniques</i> .....	6
3.3 MATERIEL FAISANT L'OBJET DE DISSEMINATION .....	6
<b>4. DISPOSITIF EXPERIMENTAL .....</b>	<b>7</b>
<b>5. EVALUATION DES RISQUES POUR LA SANTE HUMAINE ET ANIMALE .....</b>	<b>7</b>
5.1 EVALUATION DES RISQUES LIES AU TRANSGENE CP .....	7
5.2 EVALUATION DES RISQUES LIES AU TRANSGENE NPTII .....	8
<b>6. EVALUATION DES RISQUES POUR L'ENVIRONNEMENT.....</b>	<b>8</b>
6.1 DISSEMINATION POTENTIELLE DES TRANSGENES PAR LE POLLEN OU PAR LES GRAINES .....	8
6.2 DISSEMINATION DES TRANSGENES ET/OU PRODUITS DE TRANSGENES PAR LE MATERIEL VEGETATIF .....	9
6.3 TRANSFERT DE MATERIEL GENETIQUE A D' AUTRES ORGANISMES ET IMPACT SUR LES ORGANISMES NON-CIBLES .....	9
- <i>Possibilités de recombinaison entre le transgène et les populations virales infectantes</i> .....	9
- <i>Possibilités de transfert horizontal du transgène nptII vers les bactéries du sol</i> .....	9
<b>7. PRECAUTIONS PRISES POUR LIMITER LE RISQUE .....</b>	<b>10</b>
<b>8. CONCLUSIONS .....</b>	<b>10</b>
<b>9. BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>11</b>
<b>ANNEXE 1 : ELABORATION DE L'AVIS .....</b>	<b>13</b>
<b>ANNEXE 2 : DISPOSITIF DE LA PARCELLE.....</b>	<b>14</b>

## 1. Introduction

L'expérimentation proposée porte sur un essai en champ de porte-greffes de vigne exprimant un transgène d'origine virale visant à induire une protection contre le *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), agent principal de la maladie du court-noué. Cette maladie entraîne des dégâts considérables dans le vignoble français. Il n'existe ni variétés commercialisables qui soient naturellement résistantes au virus, ni méthodes curatives contre la maladie. Le vecteur du virus est un nématode qui survit exclusivement dans les sols et contamine les plants par lésion des racines. Les méthodes de prévention actuelles (prophylaxie, dévitalisation, arrachage, jachère) ont des résultats limités. De plus, aucun produit phytosanitaire n'est plus autorisé actuellement sur vigne (<http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>). La stratégie présentée par le pétitionnaire, visant à produire des porte-greffes de vigne résistants au virus par modification génétique, s'inscrit dans le cadre de la recherche d'alternatives à la lutte chimique.

Quatre dossiers de demande d'autorisation de mise au champ de porte-greffes transgéniques de vigne exprimant un transgène d'origine virale ont fait l'objet par le passé d'avis favorables de la Commission du Génie Biomoléculaire. Trois ont reçu l'autorisation du Ministère de l'agriculture.

- Le premier dossier (B/FR/94.11.04) portait sur le test de plusieurs porte-greffes transgéniques afin d'évaluer leur conformité en conditions naturelles de culture en Alsace. Leur résistance au virus n'avait pas été considérée, l'essai ayant été implanté dans un sol non infecté.
- Le deuxième dossier (B/FR/96.03.14) concernait un essai réalisé en Champagne, en sol contaminé, en 1996-1999. Parmi les 18 porte-greffes transgéniques éprouvés, trois ont montré un bon comportement de résistance au virus et ont été retenus pour le projet suivant.
- Le troisième dossier (B/FR/99.03.10) a été retiré pour permettre la mise en œuvre d'une expérience pilote de co-construction de projet de recherche grâce à une large concertation du public organisée par l'Inra. Cette concertation a mené à la création d'un comité local de suivi qui a participé à la définition du quatrième dossier.
- Le quatrième dossier (B/FR/04-05-10) a reçu l'autorisation ministérielle de mise en place de l'essai en juin 2005 et d'expérimentation jusqu'à fin décembre 2009. L'essai a été interrompu le 7 septembre 2009, les plants ayant été sectionnés juste au-dessus du sol.

L'objet de la demande que le CS du HCB examine vise à la poursuite des travaux entrepris les années précédentes afin de permettre l'obtention d'informations scientifiques supplémentaires sur ce matériel. La demande de prolongation était prévue indépendamment du sabotage de l'essai : plusieurs années de culture sont nécessaires avant l'infection des ceps et l'obtention de données analysables quant à la résistance à la maladie.

En pratique, la reprise du projet scientifique dépend de la réussite du sauvetage des plants sectionnés. Cela est envisageable par le greffage au printemps 2010 de nouveaux scions commerciaux non transgéniques sur les porte-greffes transgéniques sectionnés.

## 2. Objectifs de l'essai

Les porte-greffes transgéniques expriment un gène codant la protéine de capsid du *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), du genre *Nepovirus*, famille des *Comoviridae*. Cette expression vise à induire une résistance au virus. Le porte-greffe transgénique exprime également le gène d'*Escherichia coli nptII* (néomycine phosphotransférase II) conférant la résistance à la kanamycine. Ce gène a été utilisé pour la sélection des lignées transgéniques au laboratoire après transformation.

Les objectifs de la dissémination sont de :

- 1) confirmer le niveau de résistance de certains porte-greffes transgéniques vis-à-vis du virus et déterminer si l'efficacité observée jusqu'à présent est liée à un retard à la contamination ou à une réelle résistance ;
- 2) poursuivre l'étude de l'impact potentiel des porte-greffes transgéniques sur la dynamique des populations virales, qui résulterait de recombinaisons entre le transgène et les populations virales infectantes ;
- 3) étudier les possibilités de transfert du gène de résistance à la kanamycine vers les bactéries du sol ;
- 4) rechercher le transfert éventuel de produits du transgène du porte-greffe vers le greffon.

### 3. Caractéristiques des plantes génétiquement modifiées

L'approche méthodologique choisie consiste à rendre la vigne résistante au virus par l'expression, dans la plante, d'une séquence d'origine virale. La résistance induite pourrait résulter de la suppression post-transcriptionnelle de la production de la capsid virale par activation d'interférence ARN. Il s'agit d'un mécanisme naturel de défense des plantes impliquant la production de petits ARNs interférents (siRNA) qui proviendraient ici des ARNs du transgène et de virus infectants. Une hypothèse alternative serait un mécanisme de résistance qui implique l'action directe de la protéine de capsid codée par le transgène. Le pétitionnaire se propose d'explorer les mécanismes de résistance en jeu dans les porte-greffes transgéniques, et d'étudier la nature de sa transmission potentielle dans le greffon non transgénique.

#### 3.1 Méthode de transformation

Des cellules embryogènes obtenues à partir d'anthers du porte-greffe 41B (hybride *Vitis vinifera* x *Vitis berlandieri*) ont été transformées à l'aide d'agrobactéries portant les transgènes d'intérêt sur le plasmide recombinant pRCP1. La sélection des transformants primaires a été réalisée grâce à leur expression du gène *nptII* conférant la résistance à la kanamycine.

#### 3.2 Description moléculaire et génétique

##### - Caractéristiques génétiques de la construction

La construction transgénique portée par le plasmide pRCP1 est encadrée par les bordures droite et gauche (RB et LB) de l'ADN de transfert (ADN-T) d'un plasmide Ti (Tumor inducing) d'*Agrobacterium tumefaciens*, visant à définir la région d'ADN à transférer dans le génome de la plante. La construction comprend deux transgènes :

- 1- **le gène codant la protéine de capsid CP de la souche F13 de GFLV** (1515 nucléotides),
  - sous le contrôle transcriptionnel du promoteur du gène 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur,
  - précédé d'un codon d'initiation de la traduction et d'une séquence leader de 17 nucléotides provenant de l'ARN satellite du virus, permettant d'augmenter l'efficacité de la traduction,
  - suivi de l'extrémité de la région 3' non codante de l'ARN2 (212 nucléotides) et d'une séquence polyadénylée (33 nucléotides) du génome viral, permettant de stabiliser les ARNs messagers issus du transgène,
  - l'ensemble suivi du terminateur du gène codant la nopaline synthase (*nos*) d'*Agrobacterium tumefaciens*.
- 2- **le gène d'*Escherichia coli nptII* codant la néomycine phosphotransférase II** conférant une résistance à certains antibiotiques de la famille des aminoglycosides, notamment la kanamycine, la néomycine et la généticine. Ce gène est utilisé comme marqueur de sélection des lignées transgéniques après transformation, sous le contrôle du promoteur et du terminateur du gène *nos*.

### - Caractéristiques génétiques des porte-greffes transgéniques

Cinq lignées transgéniques sélectionnées dans les essais antérieurs sont considérées ici : trois montrant un niveau de protection relatif contre le virus : G206, G219 et G240, et deux lignées supplémentaires sensibles au virus : G68 et G77.

- Ces lignées portent une ou deux copies du transgène *CP*, ainsi que déterminé par la méthode de Southern.
- Ces lignées ayant été initialement sélectionnées par le caractère de résistance à la kanamycine, au moins une copie fonctionnelle de *nptII* y est présente. De plus, les deux transgènes étant sur le même ADN-T, et le transfert étant initié par la bordure droite, on peut en déduire que le nombre de copies de *nptII* est le même que celui de *CP*.
- Une méthode d'amplification en chaîne d'acides nucléiques (PCR), utilisant des amorces situées de part et d'autre de la bordure gauche, a permis de s'assurer de l'absence de transfert de séquence du vecteur au-delà de la séquence de l'ADN-T dans les cinq lignées transgéniques. La bordure droite n'a pas été vérifiée mais elle est rarement dépassée étant donné que le transfert de l'ADN-T est initié à droite.
- La localisation des insertions dans le génome est encore indéterminée. Le CS souhaite qu'au cours de l'expérimentation le pétitionnaire analyse les régions d'insertion des transgènes dans le génome.
- Les transgènes sont intégrés de façon stable puisqu'ils sont toujours détectés par des méthodes de Southern et de PCR plusieurs années après l'implantation des lignées au champ ainsi que dans les boutures préparées à partir de ces lignées.

### - Expression des transgènes dans le porte-greffe

L'ARN messager (ARNm) du transgène *CP* est détecté dans toutes les lignées par northern et RT-PCR. L'ARNm de *nptII* est détecté par RT-PCR. Cette expression est stable puisque les expériences de RT-PCR ont été réalisées après quatre ans de culture.

La présence des protéines *CP* et *NPTII* a été recherchée par analyse sérologique de type ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)<sup>2</sup>. La protéine *NPTII* est détectée aussi bien dans les vitroplants que dans les systèmes racinaires des porte-greffes en champ. La protéine *CP* a été détectée dans les vitroplants, mais à un niveau proche du seuil de détection dans les systèmes racinaires.

L'article de Vigne mentionne un niveau de détection par ELISA plus élevé et un nombre de sites d'insertion du transgène différent dans certaines lignées (Vigne et al., 2004b). Interrogé par le CS, le pétitionnaire a expliqué que les analyses ELISA avaient été effectuées sur des feuilles de plantes régénérées et non sur les systèmes racinaires des porte-greffes au champ, comme décrits dans la demande d'autorisation. Par ailleurs, le pétitionnaire a confirmé que le nombre de sites d'insertion du transgène *CP* est correct dans la demande d'autorisation, mais erroné dans la publication.

### **3.3 Matériel faisant l'objet de dissémination**

Le matériel proposé au champ correspond aux porte-greffes transgéniques G68, G77, G206, G219 et G240 sur lesquels sont greffés des scions, ou greffons, provenant de la variété non transgénique Pinot Meunier de vigne cultivée (*Vitis vinifera* L). Les greffons ne contiennent donc pas de transgènes, mais il serait vraisemblable d'y retrouver certains des produits de transgènes (mRNA, siRNA, protéines) par circulation dans le phloème<sup>3</sup> à partir du porte-greffe

<sup>2</sup> Dosage immuno-enzymatique sur support solide.

<sup>3</sup> Tissu conducteur dans lequel circule la sève élaborée, transportant entre autres des acides aminés et des sucres, et également des peptides et des acides nucléiques.

où ils sont initialement produits (Mlotshwa et al., 2008; Palauqui et al., 1997). Les analyses réalisées par le pétitionnaire par ELISA et RT-PCR n'ont pas mis en évidence d'ARNm ou de protéines dans les feuilles ou les inflorescences de scions, analysées après leur arrachage. Concernant la détection des protéines, le CS indique que les analyses ELISA effectuées ne sont pas les plus sensibles. En effet, si un tel transfert avait lieu, il s'effectuerait par le phloème, qui représente une portion infime (de l'ordre de 2 à 3 %) des extraits qui ont été analysés par le pétitionnaire. Le seuil de détection de protéines dans le phloème par la méthode utilisée n'est pas précisé, mais il semble inadapté au CS. Des méthodes permettant de pallier l'effet de dilution des protéines seraient plus appropriées. Ainsi, le pétitionnaire projette de faire une analyse par immuno-localisation.

#### **4. Dispositif expérimental**

L'essai est implanté sur le Domaine Expérimental du Centre de Recherche INRA de Colmar. La surface de l'essai est de 9,72 ares dont 0,54 implantés avec des plants de vigne transgéniques. La parcelle comprend au total 1588 plants dont 70 pieds transgéniques et 1518 pieds non transgéniques. Le dispositif, représenté dans l'annexe du dossier, est composé :

1. d'une zone centrale d'évaluation de la résistance de 0,48 are comportant 40 m<sup>3</sup> de sol qui ont été transférés d'une parcelle naturellement contaminée du vignoble alsacien. 50 plants transgéniques et 67 témoins non transgéniques sont analysés pour leur niveau de sensibilité vis-à-vis de l'infection naturelle par le GFLV. Ces plants sont entourés de rangs de bordure constitués de plants non transgéniques commerciaux qui servent à mesurer la progression du foyer de court-noué.
2. d'un conservatoire de plants transgéniques installé à proximité de la zone centrale. Ce conservatoire est constitué de plants transgéniques (20 individus) et non transgéniques (quatre individus). La surface du conservatoire est de 0,055 ares.
3. d'une zone de confinement constituée de plants non transgéniques (359 individus) entourant la zone centrale et le conservatoire. 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 est de 2,18 ares.
4. d'une zone de sécurité, sans culture, qui a pour objet de stopper la migration éventuelle du nématode. La surface de la zone de sécurité est de 2,25 ares.
5. d'une zone de bordure constituée exclusivement de plants non transgéniques commerciaux (1058 individus). La surface de la zone de bordure est de 5,60 ares.

L'ensemble du dispositif est protégé :

- par une bâche microporeuse installée à 1,8 m de profondeur afin de limiter le développement racinaire de la vigne et la migration des nématodes virulifères.
- par une clôture qui interdit l'accès à l'ensemble de la parcelle expérimentale aux petits animaux.

#### **5. Evaluation des risques pour la santé humaine et animale**

Aucun produit végétal n'est destiné à la consommation humaine ou animale sous quelque forme que ce soit. Les petits animaux ne peuvent accéder au site de dissémination. A l'issue de l'expérimentation, les porte-greffes seront dévitalisés, arrachés et incinérés. Le site sera traité contre les nématodes, vecteurs du virus, et aucune vigne ne sera implantée pendant au moins dix ans.

##### **5.1 Evaluation des risques liés au transgène CP**

Si un produit végétal d'un scion greffé sur un porte-greffe transgénique n'était pas éliminé

comme prévu, et était accidentellement consommé, la présence éventuelle (non détectée à ce jour) de protéines CP sur ce produit ne serait pas un élément nouveau : une telle consommation est observée, tant pour les animaux que pour l'homme, dans les conditions courantes où les produits de vignes conventionnelles proviennent de zones infestées par le GFLV. Ceci est possible du fait du développement sur plusieurs années de l'infestation par le GFLV, les pieds de vigne infestés n'étant éliminés que lorsque le viticulteur juge qu'ils ne sont plus rentables, après deux voire trois ans de progression de la maladie.

## **5.2 Evaluation des risques liés au transgène *nptII***

L'EMA (European Medicines Agency)<sup>4</sup> souligne l'importance des aminoglycosides dans l'arsenal thérapeutique anti-bactérien dans son rapport de 2007 (EMA, 2007). Comme il est noté dans ce rapport, le spectre de résistance conféré par le gène *nptII* est dirigé essentiellement contre la kanamycine, la néomycine et la généticine, sans affecter la gentamicine. Ce point est significatif car, si la kanamycine et la néomycine ont un usage vétérinaire important (néomycine principalement), c'est la gentamicine qui se trouve avoir les applications les plus développées en clinique humaine.

Comme indiqué dans le paragraphe 6.3, le CS considère que la probabilité de transfert de la résistance induite par le gène *nptII* est très faible en conditions naturelles. De plus, pour qu'un transfert ait des conséquences en santé humaine ou animale, il faudrait que les bactéries réceptrices du gène *nptII* soient des pathogènes d'hommes ou d'animaux.

Dans le cadre de cet essai, réalisé sur un terrain qui est inaccessible aux animaux et qui est fertilisé par des engrais chimiques classiques sans aucun apport organique issus d'élevage (fumures, fumier, lisier, amendements<sup>5</sup> organiques, etc.), la flore bactérienne du sol est nécessairement très pauvre en pathogènes d'hommes et d'animaux de type *Escherichia coli*.

Enfin, les infections provoquées par les rares bactéries telluriques qui sont pathogènes pour les hommes ou pour les animaux (principalement *Bacillus anthracis*, le bacille du charbon) ne sont pas traitées par des aminoglycosides. Leur traitement ne serait donc pas affecté par un éventuel gain de résistance contre les aminoglycosides.

Il peut donc être considéré que l'essai décrit dans la demande ne présente pas de risque pour la santé humaine ou animale.

## **6. Evaluation des risques pour l'environnement**

Il n'y a pas de modification de la valeur sélective de la vigne, qui serait liée à la protéine NPTII, ou, en l'absence de court-noué, à la protéine de capside du GFLV. La vigne n'est pas une espèce envahissante. L'environnement de l'essai, en termes de caractéristiques de la flore et de la faune, est bien décrit dans le dossier. Il est certifié que le site ne contient pas d'espèces protégées.

### **6.1 Dissémination potentielle des transgènes par le pollen ou par les graines**

La dissémination par le pollen est possible chez la vigne malgré une très forte autogamie. Toutefois, dans le cadre de cette expérimentation, la dissémination des transgènes via le pollen ou les graines est improbable car les porte-greffes transgéniques ne produisent pas d'inflorescence (l'hybride 41B est femelle) et les inflorescences des greffons sont non transgéniques, et de surcroît détruites.

Il n'y a donc pas d'échappement possible des transgènes via le pollen ou les graines.

---

<sup>4</sup> Agence européenne des médicaments dont la mission est de protéger et de promouvoir la santé humaine et animale pour l'Union Européenne à travers l'évaluation et la supervision des médicaments à usage humain et vétérinaire.

<sup>5</sup> Substances incorporées au sol pour en améliorer les propriétés physiques et chimiques.



## **6.2 Dissémination des transgènes et/ou produits de transgènes par le matériel végétatif**

Les porte-greffes transgéniques implantés sur le site constituent essentiellement le système racinaire des plants étudiés. Les possibilités de dissémination par recombinaison du virus avec le transgène sont abordées dans le paragraphe 6.3. Les pousses provenant éventuellement du porte-greffe transgénique seront coupées et détruites par incinération au fur et à mesure de leur apparition. A la fin de l'expérimentation, les porte-greffes seront totalement détruits par dévitalisation au glyphosate, arrachage et incinération.

Le greffon n'est pas transgénique. S'il y avait passage des produits des transgènes du porte-greffe au greffon, c'est-à-dire présence de protéines CP, ARNm ou siRNA dérivés de CP, le résultat ne serait qualitativement pas différent d'une situation naturelle dans laquelle ces protéines et acides nucléiques s'accumulent à partir du virus de GFLV lors d'une infection (voir le paragraphe 6.3). La protéine CP est plus abondante en conditions d'infestation naturelle par le virus (détection aisée de la protéine par ELISA dans des plants naturellement contaminés).

## **6.3 Transfert de matériel génétique à d'autres organismes et impact sur les organismes non-cibles**

Aucun effet de la protéine de capsid du GFLV sur les organismes autres que les virus n'est attendu.

### **Possibilités de recombinaison entre le transgène et les populations virales infectantes**

Des événements de recombinaison entre les ARN du GFLV et les ARNm du transgène ne peuvent être exclus, sans que cela n'induisse nécessairement d'effet sur la virulence du virus. La recombinaison ARN entre différentes espèces du genre *Nepovirus* ou au sein d'une espèce, en conditions expérimentales ou naturelles, est bien documentée (Le Gall et al., 1995a; Le Gall et al., 1995b). Plusieurs événements de recombinaison ont été caractérisés dans des isolats naturels de GFLV prélevés sur vigne en Tunisie (Boulila, 2007) ou en Slovénie (Pompe-Novak et al., 2007). Des variants recombinants de GFLV dans le gène de capsid virale, provenant de vignes non transgéniques, ont été caractérisés par l'équipe de l'INRA proposant l'expérimentation (Vigne et al., 2004a). Les travaux antérieurs de cette équipe n'ont toutefois pas permis de mettre en évidence ce type de virus recombinant dans les vignes constituées de porte-greffes transgéniques. La construction transgénique porte la totalité de la région 3' non codante de l'ARN génomique, potentiellement favorable à la recombinaison. Il convient toutefois de préciser que l'isolat donneur du transgène est suffisamment distant des isolats rencontrés sur vigne en Champagne pour qu'un recombinant puisse être détecté (Vigne et al., 2004b). D'autre part, le GFLV est transmis exclusivement par les nématodes du sol. Il n'existe pas de transmission par contact et pas de vecteur aérien connu. De plus, le nématode en question, *Xiphinema index*, a une faible mobilité et ne se développe efficacement que sur la vigne et le figuier. La zone de sécurité en sol nu, autour de la zone transgénique, devrait limiter la migration des nématodes vers la périphérie du site. En outre, la bâche microporeuse constitue une barrière physique à la dissémination hors du site.

La dissémination d'éventuels virus recombinants est donc improbable.

### **Possibilités de transfert horizontal du transgène *np11* vers les bactéries du sol**

La possibilité de transferts de gènes entre la plante et les bactéries n'a été démontrée qu'au laboratoire à partir de quelques plantes et avec une bactérie réceptrice modèle *Acinetobacter baylii* (Gebhard and Smalla, 1998; Kay et al., 2002; Pontiroli et al., 2009; Rizzi et al., 2008). En milieu naturel, ce transfert de transgènes vers des bactéries du sol demeure possible mais à des fréquences faibles (Demaneche et al., 2009). Le pétitionnaire se propose de vérifier dans cet essai si des séquences spécifiques du transgène sont détectées dans le métagénome (ici l'ensemble des génomes bactériens) extrait du sol de la parcelle sur laquelle sont plantées les vignes transgéniques.

En outre, le transfert de *npfl* à des bactéries du sol aurait des conséquences négligeables si l'on considère la prévalence actuelle de déterminants génétiques conférant la résistance à la kanamycine dans l'environnement sol (Smalla et al., 1993). Le caractère extrêmement limité et localisé de cet événement rendrait l'impact éventuel sur l'équilibre populationnel de la microflore du sol négligeable.

## 7. Précautions prises pour limiter le risque

Le pétitionnaire a pris un ensemble de mesures visant à minimiser l'exposition :

- En l'absence de connaissance sur le passage des produits du transgène du porte-greffe au greffon, le greffon non transgénique fait l'objet des mêmes mesures que les produits d'origine transgénique : les inflorescences sont détruites avant floraison, les produits de la taille et du rognage sont incinérés ;
- les rejets des porte-greffes sont coupés et incinérés ;
- la parcelle expérimentale est isolée par une bâche microporeuse dans le sol et une clôture empêchant la pénétration de petits animaux ;
- en fin d'essai, les plants seront dévitalisés, arrachés et incinérés ; le sol sera désinfecté avec une molécule homologuée afin de détruire les nématodes.
- Après la fin de l'essai la persistance des nématodes ainsi que la non repousse des vignes transgéniques sera suivie chaque année pendant une durée de 10 ans.
- Aucune vigne ne sera implantée pendant cette période (sauf si poursuite d'une expérimentation vigne).

La surveillance des mesures proposées ci-dessus est de la responsabilité du pétitionnaire. Le mode opératoire fourni dans le dossier du pétitionnaire est accepté par le CS du HCB. Les mesures de surveillance spécifique et générale impliquent une expertise et un compte rendu annuels, qui sont sous la responsabilité des Services Régionaux de Protection des Végétaux (SRPV-DRAAF) ou de son équivalent.

Le CS a pris connaissance et approuve les mesures préconisées par le pétitionnaire dans le cadre des plans d'urgence à déclencher en cas d'une éventuelle altération du site de l'expérimentation.

L'ensemble des mesures a pour objectif d'empêcher l'exposition de l'environnement à tout impact éventuel résultant de l'essai. Ces contraintes ont été débattues et agréées par le comité de suivi local qui a « co-construit » cette expérimentation. Le respect de ces mesures est garanti par les procédures d'assurance qualité recherche mises en place par le pétitionnaire et par le contrôle des Services Régionaux de la Protection des Végétaux.

## 8. Conclusions

Les caractéristiques de l'essai, l'environnement et les mesures prises pour contrôler le risque sont décrites de façon précise. Il n'y a pas d'indication d'effet indésirable des produits des transgènes sur la santé publique ou l'environnement. En outre, l'essai est conduit de telle façon qu'il n'y ait pas de dissémination hors du site d'expérimentation, pendant et après celle-ci.

Dans l'état actuel des connaissances, compte tenu des caractéristiques des OGM disséminés, de la taille de l'expérimentation et des mesures préventives adaptées, le CS du HCB considère que l'expérimentation telle qu'elle est décrite dans le dossier ne présente pas de risques identifiables pour la santé humaine ou animale ou pour l'environnement.

En cas d'autorisation de l'essai par les autorités compétentes, le CS du HCB rappelle le rôle des Services Régionaux de la Protection des Végétaux (SRPV-DRAAF) de la région Alsace-Lorraine pour le suivi des plans annuels de surveillance spécifique et générale pour la durée de l'essai et les dix ans suivant la fin de l'essai.

## 9. Bibliographie

Bouliila, M. (2007). Phylogeny and genetic recombination of Grapevine fanleaf virus isolates from naturally infected vineyards in Tunisia. *Phytopathol Mediterr* 46, 285-294.

Demaneche, S., David, M.M., Navarro, E., Simonet, P., and Vogel, T.M. (2009). Evaluation of functional gene enrichment in a soil metagenomic clone library. *J Microbiol Methods* 76, 105-107.

EMEA (2007). Presence of the antibiotic resistance marker gene nptII in GM plants for food and feed uses (EMEA/CVMP/56937/2007-Final).

Gebhard, F., and Smalla, K. (1998). Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl Environ Microbiol* 64, 1550-1554.

Kay, E., Vogel, T.M., Bertolla, F., Nalin, R., and Simonet, P. (2002). In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Appl Environ Microbiol* 68, 3345-3351.

Le Gall, O., Candresse, T., and Dunez, J. (1995a). Transfer of the 3' non-translated region of grapevine chrome mosaic virus RNA-1 by recombination to tomato black ring virus RNA-2 in pseudorecombinant isolates. *J Gen Virol* 76 ( Pt 5), 1285-1289.

Le Gall, O.L., Lanneau, M., Candresse, T., and Dunez, J. (1995b). The nucleotide sequence of the RNA-2 of an isolate of the English serotype of tomato black ring virus: RNA recombination in the history of nepoviruses. *J Gen Virol* 76 ( Pt 5), 1279-1283.

Mlotshwa, S., Pruss, G.J., and Vance, V. (2008). Small RNAs in viral infection and host defense. *Trends Plant Sci* 13, 375-382.

Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M., and Vaucheret, H. (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* 16, 4738-4745.

Pompe-Novak, M., Gutierrez-Aguirre, I., Vojvoda, J., Blas, M., Tomazic, I., Vigne, E., Fuchs, M., Ravnkar, M., and Petrovic, N. (2007). Genetic variability within RNA2 of Grapevine fanleaf virus. *Eur J Plant Pathol* 117, 307-312.

Pontiroli, A., Rizzi, A., Simonet, P., Daffonchio, D., Vogel, T.M., and Monier, J.M. (2009). Visual evidence of horizontal gene transfer between plants and bacteria in the phytosphere of transplastomic tobacco. *Appl Environ Microbiol* 75, 3314-3322.

Rizzi, A., Pontiroli, A., Brusetti, L., Borin, S., Sorlini, C., Abruzzese, A., Sacchi, G.A., Vogel, T.M., Simonet, P., Bazzicalupo, M., *et al.* (2008). Strategy for in situ detection of natural transformation-based horizontal gene transfer events. *Appl Environ Microbiol* 74, 1250-1254.

Smalla, K., Vanoverbeek, L.S., Pukall, R., and Vanelstas, J.D. (1993). Prevalence of nptII and Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. *FEMS Microbiol Ecol* 13, 47-58.

Vigne, E., Bergdoll, M., Guyader, S., and Fuchs, M. (2004a). Population structure and genetic variability within isolates of Grapevine fanleaf virus from a naturally infected vineyard in France: evidence for mixed infection and recombination. *J Gen Virol* 85, 2435-2445.

Vigne, E., Komar, V., and Fuchs, M. (2004b). Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus. *Transgenic Res* 13, 165-179.

## Annexe 1 : Elaboration de l'avis

L'avis a été élaboré par le **Comité scientifique du Haut Conseil des biotechnologies**, composé de :

Jean-Christophe Pagès, Président,  
Jean-Jacques Leguay, Vice-Président,

et par ordre alphabétique des noms de famille :

Yves Bertheau, Pascal Boireau, Denis Bourguet, Florence Coignard, François-Christophe Coléno, Jean-Luc Darlix, Elie Dassa, Maryse Deguergue, Hubert de Verneuil, Robert Drillien, Anne Dubart-Kupperchmitt, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Mireille Jacquemond, André Jestin, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Jane Lecomte, Olivier Le Gall, Yvon Le Maho, Didier Lereclus, Patrice Mannoni, Rémy Maximilien, Antoine Messéan, Bertrand Ney, Jacques Pagès, Daniel Parzy, Catherine Regnault-Roger, Pierre Rougé, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Virginie Tournay.

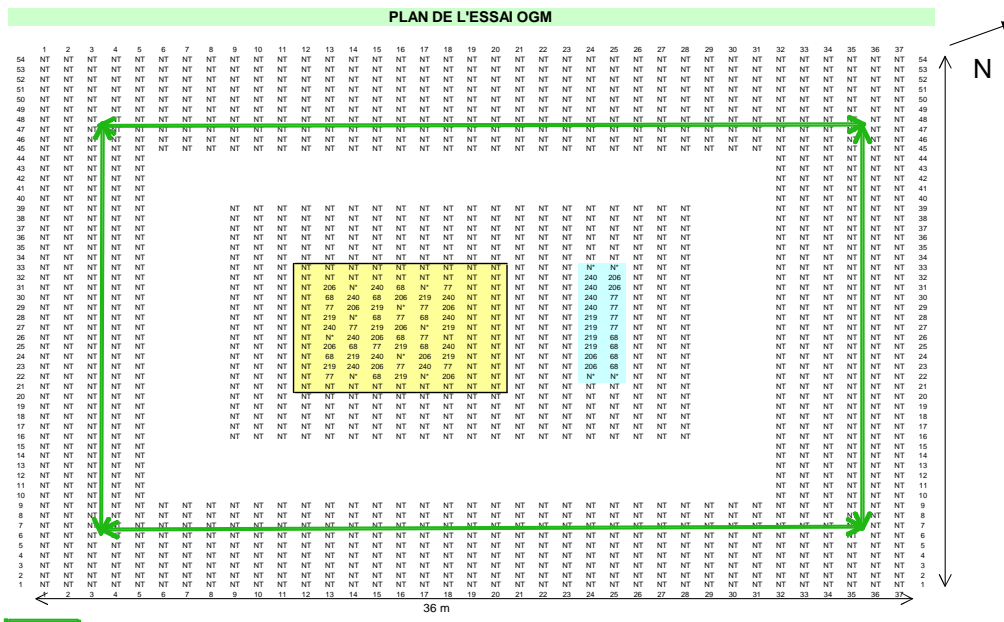
Les membres du Comité scientifique qui ont un conflit d'intérêt avec ce dossier (Olivier Le Gall et Pascal Simonet) n'ont contribué ni à l'élaboration ni à la rédaction de cet avis.

Des **rapporteurs extérieurs** ont été sollicités pour compléter l'expertise du Comité scientifique. Il s'agit de :

Xavier Nesme, Université Claude Bernard Lyon 1  
Serge Delrot, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin.

Ces rapporteurs ont chacun fourni une analyse du dossier dans leur domaine d'expertise respective, et ont été auditionnés par le Comité scientifique. Ils n'ont toutefois pas contribué directement à la rédaction de l'avis du Comité scientifique.

## Annexe 2 : Dispositif de la parcelle



- 117 plants dans la zone "contaminée" dont 50 transgéniques
- 20 transgéniques dans le conservatoire
- 1088 plants de bordure
- 1088 + 500 = 1588 pieds au total**

NT = plant de vigne non transgénique  
 68, 77, 206, 219 et 240 = plants de vigne des lignées transgéniques sélectionnées pour la dissémination

Le site de dissémination comprend **cinq zones distinctes** : **une zone centrale** (en jaune) contaminée (présence de nématodes virulifères) qui héberge 50 plants de vigne transgéniques (5 origines x 10 répétitions) ; **un conservatoire** de 20 plants de vigne transgéniques (5 origines x 4 répétitions) (bleu clair) ; **une zone de confinement** qui est implantée avec 430 plants de vigne non transgéniques ; **une zone de sécurité** qui correspond à une jachère sol nu ; et **une zone de bordure** qui est installée avec 1088 plants de vigne non transgéniques. **Un géotextile** (liseré vert) isole la zone d'expérimentation du reste de la parcelle.