

HAUT CONSEIL DES BIOTECHNOLOGIES

COMITE SCIENTIFIQUE

Paris, le 15 avril 2013

AVIS

en réponse à la saisine **130213-saisine HCB-B/FR/12.12.01**¹
concernant le dossier **B/FR/12.12.01**.

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 22 février 2013 par les Autorités compétentes françaises (le Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt) pour avis sur un dossier de demande d'autorisation d'essai au champ intitulé « **Taillis à très courte rotation de peupliers génétiquement modifiés pour les propriétés du bois - Evaluations agronomique et environnementale - Evaluation du bois pour la production de bioénergie** ».

Ce dossier a été déposé par l'Institut National de la Recherche Agronomique dans le cadre de l'article R.533-8 du code de l'environnement sous la référence **B/FR/12.12.01**.

Le Comité scientifique (CS)² du HCB a procédé à l'examen du dossier le 12 mars 2013 sous la présidence de Jean-Christophe Pagès.

¹ La saisine 130213-saisine HCB-B/FR/12.12.01 est reproduite dans l'Annexe 1.

² La composition du CS ainsi que le rapporteur externe ayant contribué à l'expertise du dossier sont indiqués dans l'Annexe 2.

RESUME DE L'AVIS³

A la demande des autorités compétentes françaises, le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a évalué le dossier B/FR/12.12.01 de demande d'autorisation d'essai au champ intitulé « Taillis à très courte rotation de peupliers génétiquement modifiés pour les propriétés du bois - Evaluations agronomique et environnementale - Evaluation du bois pour la production de bioénergie ».

Déposé par l'INRA, ce dossier est une demande d'extension pour 5 ans de l'autorisation n°07/015 du 17 septembre 2007 de l'essai au champ référencé B/FR/07.06.01. Le matériel génétique concerné par cette demande est donc déjà introduit dans l'environnement, au sein d'un dispositif expérimental précédemment établi.

La demande concerne dix lignées de peuplier grisard dont les lignines ont été modifiées dans le but de faciliter l'utilisation du bois de peuplier pour la production de biocarburant de seconde génération. L'essai vise à poursuivre la caractérisation des performances technologiques, agronomiques et environnementales de ces lignées, en conditions réalistes pour l'industrie de taillis à très courte rotation (TTCR).

Le Comité scientifique (CS) du HCB a analysé les caractéristiques de chaque lignée et évalué les risques environnementaux et sanitaires potentiellement associés à l'essai à partir du dossier, des publications afférentes, et des informations supplémentaires fournies par le pétitionnaire.

Caractéristiques des plantes génétiquement modifiées

Les dix lignées transgéniques proviennent de la transformation génétique, via *Agrobacterium tumefaciens*, du clone de peuplier grisard #717-1B4. Chaque lignée porte, en position sens ou antisens, la séquence codante d'une parmi quatre enzymes de peuplier impliquées dans la biosynthèse des lignines (CAD, COMT, CCR, CCoAOMT). Selon les lignées, les transgènes sont associés au gène marqueur de résistance à l'hygromycine (*hpt*) ou à la kanamycine (*nptII*). Aucune séquence du vecteur non destinée au transfert n'y a été détectée. Le nombre de locus d'insertions varie de 2 à au moins 6 selon les lignées.

L'expression des transgènes inhibe l'expression des gènes endogènes correspondants, réduit la production et l'activité des enzymes correspondantes, et résulte en des altérations structurelles et/ou quantitatives des lignines dans le bois, de manière spécifique et caractéristique de chaque lignée. Les transgènes sont stables dans le temps, mais leur expression et/ou les phénotypes associés à leur expression peuvent varier avec des facteurs environnementaux ou selon l'âge des arbres.

Evaluation des risques pour la santé publique

Considérant la nature des transgènes de peuplier, leurs conséquences sur le bois des lignées transgéniques, et les évaluations sanitaires des produits des gènes de résistance à l'hygromycine et à la kanamycine, le CS du HCB estime que cette expérimentation ne présente pas de risque particulier pour la santé du personnel qui entretient la plantation, récolte et manipule les échantillons de peupliers.

Evaluation des risques pour l'environnement

Considérant que les peupliers seront recepés tous les 2-3 ans dans le cadre de la conduite culturale en TTCR et que les peupliers grisards ne fleurissent pas avant au moins 4 ans de croissance, les lignées transgéniques ne pourront pas fleurir au cours de l'essai. La dissémination des transgènes par voie sexuée est donc impossible.

³ Ce résumé ne se substitue pas à l'analyse du dossier développée dans cet avis.

Du fait de la possibilité de dissémination des transgènes par voie végétative à partir des drageons ou rejets de tiges provenant de racines superficielles, le pétitionnaire a prévu une zone de protection de 3 m maintenue constamment propre par un travail superficiel du sol, un suivi régulier de sortie de drageons sur les 20 m autour de la parcelle expérimentale, et un mode efficace d'éradication par traitement herbicide. Le dossier prévoit le contrôle de la mise en œuvre de ces mesures par les agents assermentés. Ces mesures ont été jugées pertinentes par le CS du HCB pour contrôler la dissémination des transgènes par voie végétative.

Après analyse des caractéristiques des séquences d'ADN constituant les transgènes de chaque lignée, le CS du HCB a conclu que les transferts de transgènes des peupliers génétiquement modifiés aux bactéries de l'environnement tellurique avaient une probabilité extrêmement faible de se réaliser, et que s'ils venaient à se produire, de tels transferts auraient des conséquences négligeables pour la santé humaine et animale et pour l'environnement. Les conséquences d'un transfert fonctionnel des transgènes exprimant une résistance à un antibiotique seraient négligeables du fait de la présence relativement importante dans le sol de bactéries pourvues de séquences similaires. Quant aux transgènes impliqués dans la biosynthèse des lignines, s'ils étaient transférés dans des bactéries du sol, ils y représenteraient un fardeau génétique et seraient vraisemblablement contre-sélectionnés du fait de leurs caractéristiques eucaryotes inadaptées à leur expression dans des bactéries.

Compte tenu des caractéristiques des peupliers transgéniques et considérant comme réduite l'exposition aux peupliers dans le cadre du dispositif expérimental, le CS du HCB estime que l'essai proposé ne présente pas de risques significatifs pour les organismes non-cibles comme la faune ou les microorganismes. Les analyses d'impact sur les organismes non-cibles réalisées au cours des essais précédents n'ont détecté aucune différence en termes de résistance aux maladies ou de décomposition des résidus de plantes par les microorganismes. Des variations entre les différents génotypes de peupliers en relation avec les communautés ectomycorrhiziennes, mises en évidence au cours de la dernière expérimentation, ne constituent pas un risque particulier pour l'environnement.

Mesures de précaution et surveillance

En plus des mesures prévues pour la surveillance et l'éradication des drageons en cours d'essai déjà mentionnées, le pétitionnaire a prévu les mesures suivantes en fin d'expérimentation. Les plants seront recépés à une hauteur d'environ 20 cm. Un traitement herbicide au glyphosate sera appliqué pour détruire les repousses et les plants seront ensuite arrachés au cours de l'automne et détruits par le feu. Le dossier prévoit un contrôle régulier du site pendant les deux années suivantes de façon à détecter et éliminer les repousses (la première année), et vérifier l'absence de repousses (la deuxième année). Le CS du HCB recommande que la surveillance soit maintenue jusqu'à ce qu'une année de végétation se soit écoulée sans rejet de drageons. Il recommande aussi que le suivi de l'essai fasse l'objet de rapports annuels durant la période d'autorisation et durant la période de surveillance lui succédant.

Conclusions

En conclusion, compte tenu des caractéristiques des dix lignées de peupliers à lignines modifiées, du dispositif expérimental, des pratiques culturales et des mesures de précaution et de surveillance proposées, le CS du HCB considère que l'expérimentation, telle qu'elle est décrite dans le dossier B/FR/12.12.01, ne présente pas de risques identifiables pour la santé humaine ou animale ou pour l'environnement. Les mesures pour limiter la dissémination sont en adéquation avec les risques propres à l'espèce et à la conduite de l'expérimentation et de nature à prévenir toute dissémination et persistance après expérimentation.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	5
2. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ESSAI AU CHAMP	5
3. CARACTERISTIQUES DES PLANTES GENETIQUEMENT MODIFIEES	6
3.1 DESCRIPTION DES PRODUITS	6
3.2 CARACTERISTIQUES DES CONSTRUCTIONS GENETIQUES	7
3.3 METHODE DE TRANSFORMATION	7
3.4 CARACTERISTIQUES DES PEUPLIERS TRANSGENIQUES	8
4. DISPOSITIF EXPERIMENTAL	11
5. EVALUATION DES RISQUES POUR LA SANTE PUBLIQUE	11
6. EVALUATION DES RISQUES POUR L'ENVIRONNEMENT	11
6.1 DISSEMINATION POTENTIELLE DES TRANSGENES PAR LE POLLEN OU LES GRAINES	11
6.2 DISSEMINATION POTENTIELLE DES TRANSGENES PAR REPRODUCTION VEGETATIVE	12
6.3 DISSEMINATION POTENTIELLE DES TRANSGENES VERS LES BACTERIES DU SOL	12
6.4 IMPACT POTENTIEL SUR LES ORGANISMES NON-CIBLES	14
7. MESURES DE PRECAUTION ET PLANS DE SURVEILLANCE	16
8. CONCLUSIONS	16
9. BIBLIOGRAPHIE	17
ANNEXE 1 : SAISINE	19
ANNEXE 2 : ELABORATION DE L'AVIS	21
ANNEXE 3 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL	22

1. Introduction

A la demande des autorités compétentes françaises, le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a évalué le dossier B/FR/12.12.01 de demande d'autorisation d'essai au champ intitulé « Taillis à très courte rotation de peupliers génétiquement modifiés pour les propriétés du bois - Evaluations agronomique et environnementale - Evaluation du bois pour la production de bioénergie ».

Déposé par l'INRA, ce dossier est présenté comme une demande d'extension temporelle de l'autorisation de l'essai au champ de peupliers génétiquement modifiés n°07/015 du 17 septembre 2007 relative au dossier B/FR/07.06.01, lequel prolongeait et réunissait deux essais mis en place séparément sur des parcelles adjacentes en 1995⁴ et 1999⁵.

Le matériel génétique concerné par cette demande est donc déjà introduit dans l'environnement, au sein d'un dispositif expérimental précédemment établi. Par ailleurs, chacun des précédents essais auxquels fait suite cette demande de prolongation a bénéficié d'un avis favorable de la Commission du Génie Biomoléculaire⁶. Nonobstant, le CS du HCB a réalisé une nouvelle analyse des caractéristiques des peupliers génétiquement modifiés et du dispositif expérimental de cet essai pour évaluer les risques sanitaires et environnementaux de la présente demande de dissémination volontaire. Ont été considérées : les données présentées dans le dossier B/FR/12.12.01, des données publiées dans la littérature scientifique ainsi que des informations complémentaires apportées par le pétitionnaire incluant les rapports d'expérimentation annuels des précédents essais.

2. Contexte et objectifs de l'essai au champ

Les essais au champ conçus par l'INRA d'Orléans depuis 1995 s'inscrivent dans un programme de recherche visant d'une part, à acquérir une meilleure compréhension de la biosynthèse et de la mise en place des lignines dans les parois des cellules constituant le bois et d'autre part, à évaluer l'effet de modifications des lignines sur les propriétés du bois.

Constituants majeurs du bois, les lignines sont indésirables dans les processus industriels de fabrication de la pâte à papier et de production de biocarburants de seconde génération à partir de biomasse cellulosique. En modifiant l'expression de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des lignines, l'INRA cherche à produire des lignées de peupliers dont la qualité et/ou la quantité de lignines seraient optimisées pour faciliter ces utilisations technologiques sans compromettre le développement des arbres ni générer des risques pour la santé ou l'environnement. L'intérêt relatif de cette stratégie devrait ensuite être évalué en comparant la variabilité obtenue par modification génétique avec la variabilité naturelle du peuplier.

Les essais initiés en 1995 (B/FR/95.03.05 prolongé par B/FR/03.06.01) et 1999 (B/FR/99.02.15) constituaient les premières introductions dans l'environnement de lignées de peupliers GM sur le site de l'INRA d'Orléans. Les caractéristiques précédemment observées en serre sur de jeunes transformants ont pu être réévaluées au champ sur un matériel plus âgé soumis à des conditions environnementales variables. Ces lignées ont été caractérisées pour leurs performances agronomiques et leurs caractéristiques papetières, tandis que des recherches parallèles ont été menées pour analyser leurs effets éventuels sur l'environnement. Les dix lignées les plus prometteuses ont été sélectionnées pour faire partie de l'extension de l'expérimentation en 2008 (B/FR/07.06.01), réorientée vers l'évaluation de la

⁴ Premier essai autorisé pour 8 ans par la décision d'autorisation n°43 du 17 mai 1995 relative au dossier B/FR/95.03.05, prolongé pour 4 ans par la décision d'autorisation n°03/17 du 28 juillet 2003 relative au dossier B/FR/03.06.01

⁵ Deuxième essai autorisé pour 9 ans par la décision d'autorisation n°23 du 9 avril 1999 relative au dossier B/FR/99.02.15

⁶ Avis successifs de la Commission du Génie Biomoléculaire du 4 mai 1995, du 26 mars 1999, du 23 juin 2003, et du 15 juin 2007.

capacité de ces lignées à produire des biocarburants de deuxième génération dans le cadre d'une conduite culturale en taillis à très courte rotation (TTCR).

Concernant l'origine des souches et le dispositif expérimental hérités aujourd'hui de l'essai de 2008, le CS du HCB note que, en raison d'une repousse très limitée et hétérogène des arbres issus des essais mis en place en 1995 et 1999 après leur recépage en mars 2007, le pétitionnaire a pris la décision de détruire les souches en place et de replanter de nouveaux arbres à partir des lignées maintenues en culture *in vitro* (plantation en juin 2008) ou à partir de boutures de racines de l'essai détruit (plantation en mai 2009), s'écartant ainsi des plans initialement prévus dans le dossier B/FR/07.06.01. A cette occasion, le dispositif expérimental a été modifié, passant de 5 à 120 arbres par lignée, pour atteindre une densité de plantation typique d'une conduite culturale en TTCR (10 000 plants / ha) (Rapports annuels 2007, 2008 et 2009 de l'expérimentation B/FR/07.06.01).

Bien que l'expérimentation ait pris du retard par rapport aux plans du dossier B/FR/07.06.01, une première rotation de TTCR a pu être réalisée comme prévu dans le cadre de cet essai. Elle a notamment fait l'objet d'une analyse environnementale approfondie de la diversité des microorganismes du sol. Les arbres ont été recépés en février 2012 pour enchaîner sur les deuxième et troisième rotations de l'itinéraire technique de TTCR prévues dans le cadre de la présente demande d'extension d'autorisation de l'essai au champ.

Dans ce contexte, le pétitionnaire spécifie les objectifs d'expérimentation suivants⁷ : (1) approfondir et compléter les premières analyses issues de l'essai de 2008, avec l'évaluation de performances agronomiques et technologiques dans de meilleures conditions que lors de la première rotation (système racinaire bien installé, meilleurs rendements), l'évaluation de la stabilité des modifications, notamment lors des phases de réjuvenation qui accompagnent le recépage entre chaque rotation, et un suivi de la composition minérale des sols de l'essai ; (2) améliorer les analyses de capacité de peupliers à lignines modifiées à produire du bioéthanol de seconde génération dans le cadre d'un « process » technologique optimisé ; et (3) comparer la variabilité générée par modification génétique et la variabilité naturelle des peupliers, pour évaluer l'intérêt relatif de poursuivre la stratégie du génie génétique pour la production de bioénergies.

3. Caractéristiques des plantes génétiquement modifiées

3.1 Description des produits

La demande d'essai au champ concerne dix lignées de peuplier grisard portant chacune, en position sens ou antisens, la séquence codante d'une enzyme impliquée dans la biosynthèse des monolignols, unités élémentaires du polymère de la lignine.

Quatre enzymes ont été sélectionnées pour ces transformations : la Cinnamyl Alcool Déshydrogénase ou CAD (EC 1.1.1.195), la Caffeic acid O-Méthyl Transférase ou COMT (EC 2.1.1.68), la Cinnamoyl Coenzyme A Réductase ou CCR (EC 1.2.1.44) et la Caffeoyl Coenzyme A O-Méthyl Transférase ou CCoAOMT (EC 2.1.1.104).

L'effet recherché, que les séquences codantes soient insérées en position sens ou antisens, est l'inhibition de l'expression du gène endogène correspondant, par gene silencing ou co-suppression (Vaucheret, 2006). La diminution de l'activité enzymatique correspondante est susceptible de réduire la teneur en lignine ou d'en modifier la structure chez les arbres transgéniques, ce qui pourrait faciliter leur utilisation technologique pour la production de pâte à papier ou de biocarburant. Les dix lignées incluses dans l'essai ont été sélectionnées parmi un grand nombre de lignées transgéniques issues de ces transformations.

⁷ Les objectifs de l'essai sont reproduits dans cet avis pour information. Ils ne sont pas discutés par le CS du HCB, dont le mandat est d'évaluer les risques environnementaux et sanitaires de l'essai proposé.

3.2 Caractéristiques des constructions génétiques

Deux vecteurs binaires dérivés du plasmide pBIN19 ont été utilisés pour transférer les séquences codantes de ces 4 enzymes : le vecteur binaire pGSJ780A pour les séquences de CAD et COMT, et le vecteur binaire pBIBHygro pour les séquences de CCR et CCoAOMT.

Ces deux vecteurs portent une origine de répllication fonctionnelle dans *Escherichia coli* et *Agrobacterium tumefaciens*, un gène procaryote de résistance à la kanamycine, pour pGSJ780A, ou à l'hygromycine, pour pBIBHygro, et les bordures droite et gauche de l'ADN-T d'*A. tumefaciens*.

L'ADN-T du vecteur pGSJ780A (11 815 pb sans le gène d'intérêt) porte une cassette d'expression constituée du promoteur doublé de l'ARN 35S du CaMV (promoteur 70), d'un site de clonage *Bam*HI et du terminateur du gène 7 de l'ADN-T d'*A. tumefaciens* ainsi que du gène marqueur eucaryote constitué du promoteur de la nopaline synthase et du terminateur de l'octopine synthase d'*Agrobacterium* encadrant la séquence codante de NPTII (*E. coli*).

L'ADN-T du vecteur pBIBHygro (12 000 pb sans le gène d'intérêt) porte un gène marqueur eucaryote constitué du promoteur de la nopaline synthase et du terminateur du gène 7 de l'ADN-T d'*A. tumefaciens*, encadrant la séquence codante du gène *hpt* de l'hygromycine B phosphotransférase d'*E. coli* ainsi que d'un multisite de clonage et du terminateur du gène de la nopaline synthase l'ADN-T d'*A. tumefaciens*.

Construction des vecteurs de transformation

La région 3' de l'ADN-c de la COMT de peuplier (900 pb) (clone AFOCEL N0064 hybride de *Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) a été insérée en position antisens au site *Bam*HI du plasmide pGSJ780A pour donner le plasmide pGSJ780A/AS-COMT (Van Doorselaere et al., 1995).

L'ADNc complet de la CAD de peuplier (1378 pb) (clone AFOCEL N0064 hybride de *P. trichocarpa* x *P. deltoides*) (1378 pb) a été inséré en position sens et antisens au site *Bam*HI du plasmide pGSJ780A pour donner les plasmides pGSJ780A/S-CAD et pGSJ780A/AS-CAD, respectivement (Baucher et al., 1996).

L'ADNc de 1139 pb de la CCR de peuplier (clone Trichobel de *P. trichocarpa*) a été insérée en position sens et antisens entre le promoteur 70 (2x35S du CaMV) et le terminateur 35S du CaMV, puis au multisite de clonage du plasmide pBIBHygro, donnant ainsi respectivement les plasmides pBIBHygro/S-CCR et pBIBHygro/AS-CCR (Leplé et al., 2007).

L'ADNc de 1040 pb de la CCoAOMT de peuplier (clone Trichobel de *P. trichocarpa*) a été inséré en position sens entre le promoteur 70 et le terminateur 35S du CaMV, puis au multisite de clonage du plasmide pBIBHygro, donnant le plasmide pBIBHygro/S-CCoAOMT. Un fragment plus petit de 807 pb (ADNc entier moins 11 pb côté 3') a été inséré en position antisens entre le promoteur 70 et le terminateur 35S du CaMV, puis au multisite de clonage du plasmide pBIBHygro, donnant le plasmide pBIBHygro/AS-CCoAOMT (Meyermans et al., 2000).

3.3 Méthode de transformation

Les différents vecteurs binaires décrits ci-dessus ont été introduits dans *A. tumefaciens* C58C1 (pMP90). Ces bactéries ont ensuite été utilisées pour transformer des entre-nœuds de tige du clone de peuplier grisard #717-1B4 (Leplé et al., 1992). Suivant les plasmides utilisés, les cellules transformées ont été sélectionnées sur un milieu contenant de la kanamycine ou de l'hygromycine.

Les lignées obtenues après intégration de l'ADN-T de chaque plasmide cité et sélectionnées pour cette demande de dissémination sont nommées dans le dossier comme suit :

- pGSJ780A/AS-COMT : deux lignées nommées ASCOMT2B et ASCOMT10B
- pGSJ780A/AS-CAD : deux lignées nommées ASCAD21 et ASCAD52
- pGSJ780A/S-CAD : une lignée nommée SCAD1

- pBIBHygo/S-CCR : une lignée nommée WT52-3
- pBIBHygro/AS-CCR : une lignée nommée WT62-13
- pBIBHygo/S-CCoAOMT : deux lignées nommées 416 et 429
- pBIBHygo/AS-CCoAOMT : une lignée nommée 101.

3.4 Caractéristiques des peupliers transgéniques

Nombre de sites d'insertion

Des analyses moléculaires par la technique de Southern, réalisées sur chacune des lignées sélectionnées, suggèrent 2 sites d'insertion pour les lignées ASCOMT2B, ASCOMT10B, ASCAD21, ASCAD52, et 429, 3 pour la lignée 101, au moins 4 pour les lignées SCAD1 et WT62-13, 5 pour la lignée 416 et au moins 6 pour la lignée WT52-3 (Annexe 4 du dossier).

Localisation des sites d'insertion

Les Southern blots mentionnés ci-dessus ayant été réalisés sur de l'ADN nucléaire, on peut en déduire que les insertions ainsi détectées sont présentes dans le génome nucléaire de chacune des lignées.

Structure des inserts

Des expériences de PCR avec des amorces correspondant aux bordures gauche et droite de l'ADN-T suggèrent qu'aucune des lignées sélectionnées⁸ ne contient d'ADN issu de régions en bordure externe de l'ADN-T, non destinées au transfert⁹ (Annexe 3 du dossier).

Régions flanquantes et ORF¹⁰ potentiels

En l'absence de données de séquençage, aucune information n'est fournie sur les régions flanquant les différents sites d'insertion des transgènes, ou sur la présence d'ORF dans les régions d'insertion des transgènes¹¹. Le CS du HCB ne juge toutefois pas ces informations indispensables pour se prononcer sur les risques de l'essai dans les conditions d'exposition réduite et de dissémination contrôlée décrites dans le dossier.

Expression des transgènes et activités enzymatiques dans les peupliers transgéniques

L'expression des transgènes, contrôlée par le promoteur constitutif 35S ou 35S doublé, est attendue dans l'ensemble des tissus de la plante. Les enzymes endogènes correspondants étant majoritairement exprimés dans le xylème des plantes, l'extinction des gènes endogènes par gene silencing ou co-suppression devrait avoir lieu essentiellement dans le xylème, et y entraîner une réduction des teneurs et donc des activités enzymatiques.

⁸ Les données présentées en annexe 3 du dossier ont été complétées par une figure supplémentaire permettant au HCB d'évaluer les caractéristiques des insertions des lignées CAD.

⁹ Le dossier fait référence par erreur à des lignées dont les insertions débordent au-delà de l'ADN-T. Cette erreur a été confirmée par le Dr Gilles Pilate, scientifique responsable de l'essai.

¹⁰ ORF (*Open Reading Frame*) : cadre ouvert de lecture, détecté par des programmes informatiques. Suite à la détection informatique d'un ORF, des analyses supplémentaires doivent être réalisées pour tester s'il est effectivement transcrit en ARN et traduit en protéine ou en peptide.

¹¹ Les 4 sites d'insertion de la lignée WT62-13 sont en cours de clonage et séquençage (Information donnée par le Dr Jean-Charles Leplé, autre scientifique responsable de l'essai).

Caractérisation des lignées à faible activité CAD et COMT

Des hybridations moléculaires de type northern blot ont montré que la quantité d'ARN endogène de CAD est fortement réduite dans le xylème des lignées antisens ASCAD21 et ASCAD52 par rapport au témoin non transformé, et quasi absente dans la lignée sens SCAD1 (Baucher et al., 1996). De même pour la quantité d'ARN endogène de COMT, fortement réduite dans les lignées ASCOMT2B et ASCOMT10B par rapport au témoin non transformé (Van Doorselaere et al., 1995).

Ces observations sont cohérentes avec la mise en évidence d'une réduction des activités enzymatiques dans le xylème, d'environ 70 % de la CAD dans les lignées SCAD1, ASCAD21 et ASCAD52 (Van Doorselaere et al., 1995), et d'environ 95 % de la COMT dans les lignées ASCOMT2B et ASCOMT10B (Van Doorselaere et al., 1995). Une analyse par western blot vient renforcer ces résultats, montrant des teneurs en protéine COMT très réduites dans les lignées ASCOMT2B et ASCOMT10B comparées à celles du témoin non transformé (Van Doorselaere et al., 1995).

Les résultats ci-dessus ont été obtenus à partir de tissu de plantes cultivées en serre, âgées de 3 mois (Baucher et al., 1996; Van Doorselaere et al., 1995). Testées à partir de tissu extrait de branches de 2 ans développées sur des souches de 4 ans en champ (Essai B/FR/95.03.05), les activités enzymatiques de CAD et COMT montrent une réduction moins importante par rapport au témoin non transformé, et à des degrés différents selon les lignées (réduction de l'activité de CAD de 53 % dans la lignée ASCAD21 et de 68 % dans la lignée ASCAD52 ; réduction de l'activité de COMT de 56 % dans la lignée ASCOMT2B et de 85 % dans la lignée ASCOMT10B) (Pilate et al., 2002).

Caractérisation des lignées à faible activité CCR

Des expériences de RT-PCR semi-quantitative sur du xylème provenant de branches de 2 ans développées sur des souches de 7 ans en champ (Essai B/FR/99.02.15) montrent une réduction de plus de 95 % des quantités de transcrits de CCR des lignées WT52-3 et WT62-13 par rapport au témoin non transformé (Leplé et al., 2007).

Caractérisation des lignées à faible activité CCoAOMT

Des analyses de western blot montrent une réduction de 90 % de la teneur en enzyme CCoAOMT du xylème de plantes de 6 mois cultivées en serre pour les lignées 416 et 429 par rapport au témoin non transformé (Meyermans et al., 2000). Cette réduction n'est pas détectable pour le xylème de la lignée 101, à moins de séparer les régions colorées des régions non colorées (la lignée exhibe un phénotype coloré moucheté). La réduction d'activité enzymatique apparaît alors évidente dans les régions colorées par rapport aux régions non colorées, qui se comportent comme le témoin non transformé (Meyermans et al., 2000).

- Caractérisation des lignines et phénotype des peupliers transgéniques

Différents caractères susceptibles d'être affectés par l'expression des transgènes ont été évalués, comme les modifications quantitatives et qualitatives des lignines et leurs conséquences sur les propriétés du bois et le développement des arbres. Les performances technologiques ont également été caractérisées par le pétitionnaire, mais elles ne seront pas abordées dans cet avis car elles sont hors du mandat du CS du HCB qui se concentre sur l'évaluation des risques de l'essai.

Les teneurs en lignine Klason sont réduites chez certaines lignées. Les lignées à faible activité CCoAOMT (101, 416 et 429) montrent une réduction claire mais modeste de 12 % de ces teneurs dès l'âge de 3 mois en serre (Meyermans et al., 2000). Les lignées à faible activité CAD semblent affectées avec l'âge et le passage en champ : non affectées à 3 mois (Baucher et al., 1996), les teneurs en SCAD1 et ASCAD21 apparaissent réduites à 1 an en serre (Lapierre et al., 1999). Au champ, l'ensemble de ces lignées à faible activité CAD, incluant ASCAD52, montre une réduction de teneurs en lignine (Pilate et al., 2002). Les

lignées à faible activité CCR sont les lignées les plus affectées en contenu de lignine, avec une réduction de 50 % de ces teneurs en champ (Leplé et al., 2007).

La structure des lignines est plus généralement affectée dans ces lignées. Les altérations observées sont variées, comme la modification quantitative ou qualitative de composition monomérique, ou la création de nouvelles liaisons chimiques. Par ailleurs, les tendances observées ne vont pas nécessairement dans le même sens. Par exemple, le ratio entre les monomères syringuil et guayacyl (S/G) de la lignine est fortement diminué dans les lignées ASCOMT2B et ASCOMT10B (Lapierre et al., 1999; Van Doorselaere et al., 1995) tandis qu'il est légèrement augmenté dans les lignées à faible activité CCoAOMT (101, 416 et 429) (Meyermans et al., 2000).

Aucune différence morphologique n'est détectée dans le développement des différentes lignées transgéniques en serre (Baucher et al., 1996; Leplé et al., 2007; Meyermans et al., 2000; Van Doorselaere et al., 1995). Au champ, la croissance des lignées à faible activité CCR, et notamment de la lignée wt52-3 (réduction de 43 % de volume) est clairement affectée par rapport au témoin non transformé (Leplé et al., 2007), tandis que le développement des autres lignées ne semble pas affecté (Pilate et al., 2002). Toutefois, en conditions de TTCR à forte densité de plantation, les premières observations faites en 2011 et 2012 au cours de l'essai B/FR/07.06.01 montrent une réduction drastique de la croissance de la lignée SCAD1. Les lignées ASCOMT2B et ASCOMT10B semblent aussi légèrement affectées, ce qui n'avait pas été détecté dans les conditions d'essais précédents. Enfin, la croissance des lignées ASCAD21 et ASCAD52 semble supérieure à celle du témoin non transformé (Informations communiquées par le Dr Gilles Pilate, scientifique responsable de l'essai). De nouvelles analyses sont prévues pour mieux caractériser ces phénotypes.

On peut enfin noter que le bois des lignées transgéniques adopte des colorations spécifiques aux génotypes : rose pale pour les lignées ASCOMT2B et ASCOMT10B, en serre comme en champ (Lapierre et al., 1999; Pilate et al., 2002; Van Doorselaere et al., 1995), rouge pour les lignées SCAD1 (Baucher et al., 1996), ASCAD21 et ASCAD52 (Baucher et al., 1996; Lapierre et al., 1999; Pilate et al., 2002), des taches orange-marron pour les lignées WT52-3 et WT61-13 (Leplé et al., 2007), rouge rose pour les lignées 416, 429, et rouge rose moucheté pour la lignée 101 (Meyermans et al., 2000). Les patterns spécifiques de certaines de ces colorations se retrouvent dans les analyses d'histochimie, d'autofluorescence, d'activité enzymatique, et d'altération des lignines, montrant la relation forte entre la couleur du bois et le niveau d'activité de ces enzymes (Leplé et al., 2007; Meyermans et al., 2000). La coloration du xylème représente ainsi un marqueur simple d'accès pour identifier ces lignées et le niveau d'activité correspondant des enzymes.

- Stabilité et héritabilité des transgènes et de leur phénotype dans les peupliers

La conduite culturale des peupliers transgéniques n'ayant pas permis de production de graines¹², la transmission des transgènes à leur descendance n'a pas pu être observée.

Le phénotype de réduction de l'expression des différentes enzymes de la synthèse de lignine en champ semble s'atténuer avec l'âge de l'arbre mais se révèle à nouveau lorsque l'arbre est recépé dans les rejets de jeunes tiges, montrant que les insertions sont toujours présentes dans le génome de ces lignées clonales. Les transgènes sont donc stables, mais l'expression des transgènes, ou les conséquences de l'expression de ces transgènes peuvent varier avec des facteurs environnementaux et avec l'âge des arbres.

¹² Depuis 2008, les arbres sont cultivés en TTCR, impliquant des recépages tous les 2-3 ans, bien avant la période de 4 ans minimale nécessaire à la floraison. Dans les essais précédents, de 1995 à 2007, les chatons floraux étaient systématiquement enlevés dès leur apparition sur les arbres.

4. Dispositif expérimental

La parcelle expérimentale est établie au sein de la pépinière de l'Unité AGPF de l'INRA d'Orléans. Les arbres ont été plantés dans le cadre de l'essai B/FR/07.06.01¹³ selon un dispositif expérimental reproduit dans l'Annexe 3, comprenant 1440 arbres (120 par lignée transgénique et 240 de la lignée non transformée) distribués sur une superficie de 1 365 m² (densité de 10 000 plants / ha caractéristique de la conduite en TTCR).

La zone plantée est entourée d'une zone de protection de 3 m maintenue constamment propre par un travail superficiel du sol. Un périmètre de 20 m autour de la parcelle est régulièrement contrôlé par traitement herbicide pour toute apparition de drageons.

L'essai est conduit selon les pratiques culturales de taillis à très courte rotation, impliquant un recépage tous les 2-3 ans. La première rotation a été effectuée dans le cadre de l'essai B/FR/07.06.01. La présente demande d'extension de 5 ans devrait couvrir les deuxième et troisième rotations de l'itinéraire cultural.

5. Evaluation des risques pour la santé publique

Les peupliers, et *a fortiori* les peupliers génétiquement modifiés qui font l'objet de cette expérimentation, ne sont pas destinés à l'alimentation. Le CS du HCB a évalué les risques pour le personnel exposé aux peupliers sur le site d'expérimentation.

Les transgènes correspondant aux séquences des enzymes CAD, COMT, CCR et CCoAOMT en position antisens n'expriment aucun produit. Les transgènes correspondant aux séquences de ces enzymes en position sens expriment des protéines déjà présentes dans le peuplier. Il ne peut donc y avoir de toxicité ou d'allergénicité particulière associée aux produits de ces transgènes.

L'expression de ces deux types de transgènes a pour effet de modifier les niveaux de production endogène d'enzymes de biosynthèse des lignines, entraînant des altérations structurelles ou quantitatives des lignines dans le bois. Aucune information n'indique que ces modifications qualitatives du bois dans ces lignées de peupliers transgéniques pourraient avoir un effet sur la santé du personnel qui entretient la plantation, récolte et manipule les échantillons.

Enfin, les produits des gènes de résistance à la kanamycine (NPTII) et à l'hygromycine (HPT) présents dans ces peupliers ont fait l'objet d'analyses de toxicité et d'allergénicité ; aucun effet négatif n'a été mis en évidence (Fuchs et al., 1993; Lu et al., 2007; Zhuo et al., 2009).

De ce fait, le CS du HCB considère que cette expérimentation de lignées de peupliers à lignines modifiées ne présente pas de risque particulier pour la santé du personnel.

6. Evaluation des risques pour l'environnement

6.1 Dissémination potentielle des transgènes par le pollen ou les graines

La lignée de peuplier #717-1B4 réceptrice des transgènes est un clone femelle. Les fleurs des lignées transgéniques de peupliers ne produisent donc pas de pollen.

De plus, ces peupliers seront recepés tous les 2-3 ans dans le cadre de la conduite culturale en TTCR. La première floraison des peupliers grisards ayant lieu après au moins 4 ans de

¹³ Les arbres des lignées CAD, COMT et CCR ont été plantés en 2008, et les arbres des lignées CCoAOMT en 2009. L'ensemble des arbres de l'essai a été recepé en 2010 pour homogénéisation (voir rapports d'expérimentation des années 2008, 2009, et 2010).

croissance¹⁴, ils n'atteindront jamais le stade de floraison¹⁵. Ils ne produiront donc pas de graines.

En l'absence de pollen et de graines, la dissémination par voie sexuée est impossible.

6.2 Dissémination potentielle des transgènes par reproduction végétative

La propagation par voie végétative (voie asexuée) est un élément important de la dissémination du peuplier (Stettler et al., 1996). Cette propagation peut se réaliser à partir des racines d'un individu parent qui vont produire des drageons (partie aérienne avec tige et feuilles issue de racines), drageons qui par la suite pourraient donner des arbres, et des fleurs. Cette production de drageons se fait à la verticale de racines superficielles (proches de la surface du sol, entre 0 et 50 cm), et peut se produire sur toute la longueur des racines, c'est-à-dire aussi bien à proximité de l'individu initial (un ou deux mètres), qu'à l'extrémité la plus distale de l'arbre où une racine est présente (plusieurs dizaines de mètres). Ainsi tant qu'il existe des racines superficielles, il y a possibilité de présence de drageons.

Les indications fournies sur la qualité du sol (sol très filtrant, de texture sableuse) indiqueraient un enracinement plutôt profond. En effet, une des fonctions des racines étant d'aller puiser l'eau dans le sol, sur ce type de sol, les enracinements sont plutôt orientés vers la profondeur du sol.

Par ailleurs, il est connu que la sortie de drageons est facilitée par des blessures, sur ces racines superficielles, dues à des outils de travail du sol. Les travaux du sol réalisés sur la zone expérimentale incluent hersage et désherbage chimique. Le hersage, bien que généralement réalisé à faible profondeur, peut provoquer des blessures racinaires s'il existe des racines superficielles. Un désherbage chimique étant prévu pour supprimer la concurrence végétale pouvant réduire la croissance des peupliers sur ce type de sol, le hersage pourrait éventuellement être évité si les drageons devenaient trop nombreux ou difficiles à gérer.

Le choix de faire un suivi régulier de sortie de drageons sur les 20 m autour de la parcelle expérimentale apparaît raisonnable. Par ailleurs, le mode d'éradication par traitement herbicide est efficace, surtout si ces drageons sont traités avant lignification.

Interrogé sur les données de suivi concernant l'existence et l'élimination de drageons autour des peupliers pendant les essais, et après la destruction de 2007, le pétitionnaire a indiqué que depuis 2008-2009, sur l'essai B/FR/07.06.01 en configuration TTCR, de l'ordre d'une à quelques centaines de drageons sont effectivement éliminés chaque année, après la phase de croissance des peupliers, en bordure interne (proche de l'essai) de la zone de sécurité. Par ailleurs, aucun drageon n'a été observé suite à la destruction des souches en 2007.

6.3 Dissémination potentielle des transgènes vers les bactéries du sol

Les études réalisées en laboratoire et en serre sur des modèles d'étude composés de plantes transgéniques variées et de quelques bactéries naturellement transformables utilisées comme réceptrices montrent qu'un transfert de transgène des plantes aux bactéries de l'environnement est susceptible de se réaliser à des fréquences suffisamment élevées pour être détectables (Gebhard and Smalla, 1998; Kay et al., 2002; Pontiroli et al., 2009; Rizzi et al., 2008). Cette possibilité de transfert de transgène à des fréquences significatives, donc détectables, est fortement limitée aux séquences procaryotiques qui s'intègrent par recombinaison homologue ou homéologue dans les régions de forte similarité nucléotidique présentes dans les génomes bactériens (et potentiellement des Archeae), le seul mécanisme susceptible de permettre un transfert d'ADN entre la plante et des bactéries étant la transformation bactérienne.

¹⁴ Information certifiée par Gilles Pilate de par l'expérience de 20 ans de son laboratoire avec les peupliers grisards.

¹⁵ Affirmation également attestée par le rapporteur externe de l'Institut du Développement Forestier.

Les autres séquences typiquement végétales des génomes des plantes GM sont également susceptibles d'être intégrées dans les génomes bactériens par recombinaison illégitime mais de tels événements ne peuvent se réaliser qu'à des fréquences extrêmement faibles, donc non détectables dans l'état actuel des outils disponibles. Par ailleurs, de telles séquences de plantes constitueraient un fardeau génétique pour l'organisme récepteur puisque ne pouvant s'y exprimer et ne seraient généralement pas fixées dans ces génomes (phénomène de contre-sélection).

Les potentialités de transfert de transgènes des plantes concernées aux bactéries de l'environnement sont donc fortement conditionnées aux séquences et à l'origine des gènes qui le composent.

Les lignées de peupliers transgéniques qui font l'objet de ce dossier portent une ou plusieurs copies d'un transgène constitué de la séquence codante d'un gène de biosynthèse de lignine en position sens ou antisens et d'un gène marqueur de résistance à un antibiotique (kanamycine ou hygromycine).

Les gènes de biosynthèse de lignine en position sens ou antisens ne posent pas de problèmes particuliers en ce qui concerne leur transfert vers la microflore du sol : ils ne présentent aucune spécificité particulière les différenciant des gènes naturellement présents dans ces végétaux. Aucune séquence similaire avec laquelle ces gènes pourraient éventuellement interférer, que ce soit en position sens ou antisens, n'est présente chez les bactéries. Enfin, de nature entièrement eucaryote, ces séquences ne pourraient pas s'exprimer dans les bactéries, où elles constitueraient un fardeau génétique.

Les gènes de résistance à la kanamycine (*nptII*) ou à l'hygromycine (*hpt*) sont des séquences d'origine procaryotique dans un contexte moléculaire eucaryotique (séquences promotrices et de terminaison d'origine végétale). L'occurrence élevée, dans le sol, de bactéries donatrices de ces gènes signifie qu'il y aura, dans les génomes des bactéries telluriques, de nombreuses séquences de totale similarité avec les séquences codantes des transgènes sur lesquelles pourra s'amorcer la recombinaison homologue et donc se réaliser le transfert entre la plante transgénique et les bactéries.

Si ces gènes étaient transférés à partir des peupliers transgéniques avec leurs séquences promotrices et de terminaison d'origine végétale, ils ne pourraient être exprimés dans un contexte procaryotique et le segment transféré risquerait de devenir un fardeau génétique susceptible d'être contre-sélectionné.

Si seule la partie codante des transgènes était transférée par recombinaison homologue avec les gènes similaires dans les bactéries, un tel transfert conduirait à remplacer une copie indigène par la copie provenant de la plante, sans conséquence notable sur l'expression. Au pire, l'événement de transformation rendrait fonctionnelle une copie jusque-là non fonctionnelle d'une de ces bactéries environnementales. Dans tous les cas, la présence dans le sol à des niveaux populationnels élevés de bactéries pourvues de séquences similaires à celles de ces transgènes, comme c'est particulièrement le cas avec le gène *bla* (Demaneche et al., 2008), signifie que l'acquisition par une bactérie d'une copie fonctionnelle de ces gènes n'aurait qu'une probabilité infime de modifier la structure de la communauté bactérienne tellurique, et avec des conséquences négligeables.

Le CS du HCB note par ailleurs que le peuplier n'est pas une plante développant des symbioses fixatrices d'azote avec des nodosités sur les racines. De ce fait, il n'existe pas vraiment de niches à l'intérieur desquelles une bactérie spécifique pourrait être en contact avec l'ADN du végétal et potentiellement soumise à une exposition importante avec l'ADN des transgènes.

Les transferts de transgènes de ces peupliers génétiquement modifiés aux bactéries de l'environnement tellurique ont donc une probabilité extrêmement faible de se réaliser, et s'ils venaient à se produire, auraient des conséquences négligeables pour la santé humaine et animale et pour l'environnement.

6.4 Impact potentiel sur les organismes non-cibles¹⁶

Compte tenu de la nature des transgènes, des caractéristiques des peupliers transgéniques en termes d'impact sanitaire (rappelées au chapitre 5), en termes de dissémination (présentées dans les sections précédentes du chapitre 6) et considérant que l'exposition des organismes non-cibles à ces peupliers est réduite dans le cadre du dispositif expérimental (présenté dans le chapitre 4), le CS du HCB estime que l'essai proposé ne présente pas de risques significatifs pour les organismes non-cibles comme la faune ou les microorganismes.

Des analyses supplémentaires d'impact sur les organismes non-cibles ont été réalisées au cours des essais précédents pour mieux caractériser les performances agronomiques des lignées transgéniques et pour identifier d'éventuels impacts environnementaux d'une culture de ces peupliers à plus grande échelle.

Une première série d'analyses d'impact sur les organismes non-cibles a été effectuée sur les lignées de peuplier ASCOMT2B, ASCOMT10B, ASCAD21 et ASCAD52 au cours d'un essai au champ réalisé en Angleterre en parallèle à l'essai français B/FR/95.03.05 (Halpin et al., 2007; Hopkins et al., 2007; Pilate et al., 2002; Tilston et al., 2004). Ces analyses ont été complétées par des analyses plus poussées et plus approfondies, réalisées à partir d'échantillons provenant de l'essai B/FR/07.06.01, sur la biodiversité des champignons du sol associés aux lignées de peuplier ASCAD21 et ASCAD52 (Danielsen et al., 2012), et sur les ectomycorhizes associées aux lignées ASCOMT2B, ASCOMT10B, SCAD1, ASCAD21, ASCAD52, WT52-3 et WT62-3 en comparaison à des lignées commerciales de peuplier (Danielsen et al., 2013). Les résultats de ces analyses sont résumés ci-dessous.

Résistance aux pathogènes

Les lignines sont connues pour jouer un rôle dans le développement mais également dans la résistance aux pathogènes (Bonawitz and Chapple, 2010). Surveillées annuellement au cours de l'essai anglais, les attaques d'insectes, de champignons et de bactéries n'ont produit aucune différence significative de dégâts sur feuilles ou de symptômes de maladies entre lignées transgéniques et témoin non transformé (Halpin et al., 2007; Pilate et al., 2002)¹⁷. Il est toutefois souligné qu'aucune infestation majeure ne s'est produite durant la période d'observation (Pilate et al., 2002).

Décomposition des résidus de plantes par les microorganismes du sol

Il a été argumenté qu'un phénotype de peuplier avec une teneur moindre en lignine pourrait constituer un risque environnemental du fait d'une dégradation accélérée de la litière, qui entraînerait une augmentation des émissions de gaz à effet de serre (Talukder, 2006). Ceci serait dû au fait que les enzymes microbiennes pourraient atteindre les polysaccharides plus facilement en l'absence de la barrière physique que représente le polymère de lignine particulièrement résistant à la dégradation (Talukder, 2006).

Les taux de décomposition des racines et résidus de peupliers transgéniques par les microorganismes semblaient initialement plus importants pour les lignées transgéniques par rapport à la lignée témoin non transformée (Pilate et al., 2002). Mais une étude similaire

¹⁶ La terminologie « organismes cibles/organismes non-cibles » provient de l'évaluation des risques des OGM ciblant des organismes particuliers (comme les insectes ciblés par les protéines transgéniques Bt). L'expression « organismes non-cibles » a été conservée dans ce cadre pour faire référence à la biodiversité environnante, même en l'absence d'organismes cibles.

¹⁷ D'après Gilles Pilate, les enzymes utilisées pour la transformation de ces peupliers ne sont *a priori* pas impliquées dans le pathway des lignines qui jouent un rôle dans la résistance aux pathogènes. Il existerait en effet des familles de gènes pour chacune des activités enzymatiques concernées, au sein desquelles certains membres seraient impliqués dans le développement alors que d'autres seraient impliqués dans la résistance aux pathogènes (Campbell and Sederoff, 1996). Les lignées transgéniques ont été conçues de telle sorte que la réduction d'activité enzymatique des lignées serait spécifique de certains membres de ces familles, non impliqués dans la résistance aux pathogènes. Des expériences en conditions contrôlées devraient permettre d'évaluer de manière plus fine ces phénotypes de résistance aux maladies (Information donnée par Gilles Pilate).

effectuée sur une plus longue durée indique que les variations des conditions environnementales durant la croissance des arbres au champ ont plus d'influence sur leur taux de décomposition future que les différences entre génotypes de peupliers (Hopkins et al., 2007; Tilston et al., 2004).

Biodiversité microbienne

L'analyse des activités métaboliques de différents échantillons du sol n'a mis en évidence aucune différence significative de diversité microbienne entre lignées transgéniques (ASCOMT2B, ASCOMT10B, ASCAD21 et ASCAD52) et témoin non transformé (Halpin et al., 2007; Pilate et al., 2002). Ce résultat n'est toutefois pas surprenant considérant la méthode expérimentale relativement grossière utilisée pour ces analyses.

L'étude des communautés fongiques dans les racines et le sol a été réalisée de manière plus fine par une approche métagénomique (Danielsen et al., 2012). Avec des méthodes de pyroséquençage 454 présentant des niveaux de sensibilité et de spécificité parmi les plus élevés aujourd'hui, aucune différence significative de communautés fongiques n'a pu être détectée entre les lignées transgéniques analysées (ASCAD21 et ASCAD52) et la lignée témoin non transformée, chez des peupliers d'un an (Danielsen et al., 2012).

Une dernière étude a permis de mettre en évidence une forte structuration des communautés fongiques ectomycorhiziennes selon les génotypes de peupliers après deux ans de développement, correspondant à une colonisation ectomycorhizienne des racines proche de 100 % pour toutes les lignées étudiées (Danielsen et al., 2013). L'expérience était élargie aux lignées transgéniques ASCOMT2B, ASCOMT10B, SCAD1, ASCAD21, ASCAD52, WT52-3 et WT62-3, et aux lignées non transgéniques incluant le témoin non transformé (*P. canescens*) et 3 lignées commerciales de peuplier hybride *P. euramericana*. Aucun lien n'a pu être mis en évidence entre la nature des transgènes (c'est-à-dire la suppression des activités enzymatiques CCR, CAD ou COMT) et les variations observées entre génotypes de peupliers (Danielsen et al., 2013). Les auteurs soulignent que les variations de composition des communautés ectomycorhiziennes observées entre lignées transgéniques étaient du même ordre que les variations observées entre lignées commerciales de peupliers *P. euramericana* (Danielsen et al., 2013). S'il est difficile d'établir une telle comparaison à partir des analyses proposées, le CS du HCB reconnaît que d'importantes variations de composition de communautés ectomycorhiziennes sont observées entre génotypes des lignées commerciales, entre génotypes des lignées transgéniques, (indépendamment de la nature des transgènes insérés), et avec le témoin non transformé (les données présentées ne permettent pas d'affirmer une absence de différence entre les lignées transgéniques et le témoin non transformé).

L'étude de Danielsen (2013) met également en évidence un lien entre une variabilité des taux de colonisation ectomycorhizienne précoce des différents génotypes, et des différences marquées de croissance et de production de biomasse entre lignées transgéniques (Danielsen et al., 2013). Des analyses supplémentaires sont prévues sur ces différents phénotypes.

Les spécificités des différentes lignées transgéniques de peuplier mises en évidence par Danielsen (2013) en termes de colonisation ectomycorhizienne, de croissance et de biomasse, ne constituent pas un risque particulier pour l'environnement.

Ainsi, les analyses d'impact sur les organismes non-cibles réalisées au cours des essais précédents confirment que l'essai ne présente pas de risques significatifs pour l'environnement à l'échelle de l'expérimentation et dans les conditions de dissémination contrôlée décrites dans le dossier.

7. Mesures de précaution et plans de surveillance

Le mode de conduite en taillis à très courte rotation appliquée à cette expérimentation interdit la floraison et, *a fortiori*, la production de graines. En revanche, la multiplication végétative par drageons peut déboucher sur la production de jeunes arbres à proximité du site. Pour prévenir cette dissémination, le pétitionnaire prévoit :

- une « zone de protection de 3 m maintenue constamment propre par un travail superficiel du sol »
- un « périmètre de 20 m autour de la parcelle expérimentale [où] toute apparition de drageons (aisément identifiables) sera régulièrement contrôlée par traitement herbicide ».

En fin d'expérimentation, les plants seront recépés à une hauteur de 20 cm en moyenne (fin de la troisième rotation). Un traitement herbicide au glyphosate sera appliqué pour détruire les repousses et les plants seront ensuite arrachés au cours de l'automne et détruits par le feu. Ce protocole a été mis au point et éprouvé par l'Unité Expérimentale pour l'élimination des peupliers avant replantation et aucun rémanent n'a été observé.

Il n'y a pas de nouvelle implantation ici, donc pas d'entrée de matériel biologique. En revanche, s'il est indiqué comment le matériel recueilli pour analyse est détruit à la fin de l'expérimentation, le dossier ne le précise pas pour les analyses intermédiaires. La question a été posée au pétitionnaire. Les procédures spécifiées en retour pour la manipulation et l'élimination des échantillons analysés au laboratoire ont été jugées satisfaisantes par le CS du HCB.

En ce qui concerne la surveillance, le site d'expérimentation est inclus dans la pépinière de l'Unité AGPF de l'INRA d'Orléans et la zone expérimentale est une zone régulièrement entretenue, réservée aux expérimentations impliquant des peupliers génétiquement modifiés, ce qui rend cette surveillance par le personnel de l'Unité aisée. En outre, le site est protégé par la clôture générale du Centre et par une clôture d'isolement de parcelles de pépinière.

Pendant la culture, la mise en œuvre des mesures de prévention est contrôlée par les agents assermentés. Après la destruction de l'essai, le dossier prévoit un contrôle régulier du site pendant les deux années suivantes de façon à détecter et éliminer les repousses (la première année), et vérifier (la deuxième année) l'absence de repousses. Ceci pourrait être attesté par la surveillance et, le cas échéant, la surveillance pourrait se prolonger en cas de présence résiduelle de drageons (même si cela n'a jamais été observé). Le CS du HCB recommande de mettre en jachère la parcelle et le périmètre de 20 m pendant au moins un an afin de contrôler l'absence de rejet pouvant survenir à partir d'éventuelles racines vivantes restées dans le sol après arrachage. Seule une année de végétation sans aucun rejet serait une garantie de destruction totale des racines de peuplier. L'apparition d'un drageon impliquerait la réinitiation de cette période de surveillance d'un an.

En conclusion, les mesures pour limiter la dissémination sont en adéquation avec les risques de dissémination propres à l'espèce et à la conduite de l'expérimentation. Elles sont de nature à prévenir toute dissémination et persistance après expérimentation. Le contrôle des mesures est aisé à pratiquer. Enfin, il est suggéré au pétitionnaire de rendre compte de toute observation inattendue en termes d'impact environnemental.

8. Conclusions

Au terme de l'analyse du dossier B/FR/12.12.01 et de données supplémentaires fournies par le pétitionnaire et disponibles dans la littérature scientifique, compte tenu des caractéristiques des dix lignées de peupliers à lignines modifiées, du dispositif expérimental, des pratiques culturales et des mesures de précaution et de surveillance adaptées, le CS du HCB considère que l'expérimentation telle qu'elle est décrite dans le dossier B/FR/12.12.01 ne présente pas de risques identifiables pour la santé humaine ou animale ou pour l'environnement. A la fin de l'essai, le CS du HCB recommande que la surveillance soit maintenue jusqu'à ce qu'une

année de végétation se soit écoulée sans rejet de drageons, et que le suivi de l'essai fasse l'objet de rapports annuels durant la période d'autorisation et durant la période de surveillance y faisant suite.

9. Bibliographie

Baucher, M., Chabbert, B., Pilate, G., Van Doorselaere, J., Tollier, M.T., PetitConil, M., Cornu, D., Monties, B., VanMontagu, M., Inze, D., *et al.* (1996). Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar. *Plant Physiol* **112**, 1479-1490.

Bonawitz, N.D., and Chapple, C. (2010). The Genetics of Lignin Biosynthesis: Connecting Genotype to Phenotype. In *Annual Review of Genetics*, Vol 44, pp. 337-363.

Campbell, M.M., and Sederoff, R.R. (1996). Variation in lignin content and composition - Mechanism of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiol* **110**, 3-13.

Danielsen, L., Lohaus, G., Sirrenberg, A., Karlovsky, P., Bastien, C., Pilate, G., and Polle, A. (2013). Ectomycorrhizal colonization and diversity in relation to tree biomass and nutrition in a plantation of transgenic poplars with modified lignin biosynthesis. *PLoS One* **8**, e59207.

Danielsen, L., Thurmer, A., Meinicke, P., Buee, M., Morin, E., Martin, F., Pilate, G., Daniel, R., Polle, A., and Reich, M. (2012). Fungal soil communities in a young transgenic poplar plantation form a rich reservoir for fungal root communities. *Ecology and Evolution* **2**, 1935-1948.

Demanèche, S., Sanguin, H., Pote, J., Navarro, E., Bernillon, D., Mavingui, P., Wildi, W., Vogel, T.M., and Simonet, P. (2008). Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3957-3962.

Fuchs, R.L., Ream, J.E., Hammond, B.G., Naylor, M.W., Leimgruber, R.M., and Berberich, S.A. (1993). Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. *Bio-Technology* **11**, 1543-1547.

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

Halpin, C., Thain, S.C., Tilston, E.L., Guiney, E., Lapierre, C., and Hopkins, D.W. (2007). Ecological impacts of trees with modified lignin. *Tree Genet Genom* **3**, 101-110.

Hopkins, D.W., Webster, E.A., Boerjan, W., Pilate, G., and Halpin, C. (2007). Genetically modified lignin below ground. *Nat Biotechnol* **25**, 168-169.

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.

Lapierre, C., Pollet, B., Petit-Conil, M., Toval, G., Romero, J., Pilate, G., Leplé, J.C., Boerjan, W., Ferret, V., De Nadai, V., *et al.* (1999). Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiol* **119**, 153-163.

Leplé, J.C., Brasileiro, A.C.M., Michel, M.F., Delmotte, F., and Jouanin, L. (1992). Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Rep* **11**, 137-141.

Lep le, J.C., Dauwe, R., Morreel, K., Storme, V., Lapierre, C., Pollet, B., Naumann, A., Kang, K.Y., Kim, H., Ruel, K., *et al.* (2007). Downregulation of cinnamoyl-coenzyme a reductase in poplar: Multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure. *Plant Cell* 19, 3669-3691.

Lu, Y., Xu, W., Kang, A., Luo, Y., Guo, F., Yang, R., Zhang, J., and Huang, K. (2007). Prokaryotic expression and allergenicity assessment of hygromycin B phosphotransferase protein derived from genetically modified plants. *J Food Sci* 72, M228-M232.

Meyermans, H., Morreel, K., Lapierre, C., Pollet, B., De Bruyn, A., Busson, R., Herdewijn, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Marita, J.M., *et al.* (2000). Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *J Biol Chem* 275, 36899-36909.

Pilate, G., Guiney, E., Holt, K., Petit-Conil, M., Lapierre, C., Leple, J.C., Pollet, B., Mila, I., Webster, E.A., Marstorp, H.G., *et al.* (2002). Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nat Biotechnol* 20, 607-612.

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.

Stettler, R., Bradshaw, T., Heilman, P., and Hinckley, T. (1996). *Biology of Populus and its implications for management and conservation* (NRC Research Press).

Talukder, K. (2006). Low-lignin wood - a case study. *Nat Biotechnol* 24, 395-396.

Tilston, E.L., Halpin, C., and Hopkins, D.W. (2004). Genetic modifications to lignin biosynthesis in field-grown poplar trees have inconsistent effects on the rate of woody trunk decomposition. *Soil Biology & Biochemistry* 36, 1903-1906.

Van Doorselaere, J., Baucher, M., Chognot, E., Chabbert, B., Tollier, M.T., PetitConil, M., Leple, J.C., Pilate, G., Cornu, D., Monties, B., *et al.* (1995). A novel lignin in poplar trees with a reduced caffeic acid 5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase activity. *Plant J* 8, 855-864.

Vaucheret, H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev* 20, 759-771.

Zhuo, Q., Piao, J.H., Tian, Y., Xu, J., and Yang, X.G. (2009). Large-scale Purification and Acute Toxicity of Hygromycin B Phosphotransferase. *Biomed Environ Sci* 22, 22-27.

Annexe 1 : Saisine



Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT

Direction générale de
l'alimentation

Service de la prévention
des risques sanitaires de
la production primaire

Sous direction de la
qualité et de la protection
des végétaux

Bureau de la
biovigilance, des
biotechnologies et de la
qualité des végétaux

251, rue de Vaugirard
75732 Paris cedex 15

Monsieur Jean-François DHAINAUT
Président du Haut conseil des
biotechnologies
à l'attention de Monsieur Hamid Ouahioune
3 place de Fontenoy
75007 PARIS

Paris, le

22 FEV. 2013

Objet : saisine du Haut conseil des biotechnologies sur un dossier de demande d'autorisation d'essai au champ

Références : 130213-saisine HCB-dossier B/FR/12.12.01

Affaire suivie par : Anne Grevet

tél. : 01 49 55 58 25 fax : 01 49 55 59 49

courriel : anne.grevet@agriculture.gouv.fr

Monsieur le Président,

La demande d'autorisation suivante, pour un essai au champ de plantes génétiquement modifiées, a été déposée auprès du Ministère chargé de l'agriculture :

Titre : Taillis à très courte rotation de peupliers génétiquement modifiés pour les propriétés du bois - Evaluations agronomique et environnementale - Evaluation du bois pour la production de bioénergie.

Demandeur : Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Centre de Recherche d'Orléans.

Référence : B/FR/12.12.01.

Date d'enregistrement par le Ministère : 20 décembre 2012.

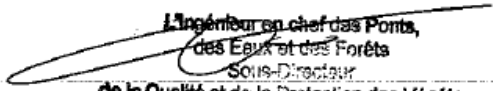
Le Ministère chargé de l'agriculture a demandé des informations complémentaires sur la demande d'autorisation le 7 janvier 2013, apportées par le demandeur le 12 février 2013.

Conformément à l'article R.533-8 du code de l'environnement, j'ai l'honneur de vous demander, par la présente saisine, de bien vouloir procéder à une évaluation de ce dossier afin de rendre un avis pour le **26 mars 2013**, sous réserve d'éventuelles demandes d'informations complémentaires.

Le ministère chargé de l'agriculture peut, à tout moment, par une demande motivée, inviter le demandeur à lui communiquer des informations complémentaires. La période comprise entre la demande d'information et la réponse n'est pas prise en compte dans le calcul du délai de 60 jours imparti au HCB pour rendre son avis.

Le Haut Conseil peut également demander directement des informations complémentaires au demandeur.

Je vous prie de croire, Monsieur le Président, à l'assurance de ma considération distinguée.


~~L'ingénieur en chef des Ponts,
des Eaux et des Forêts~~
Sous-Directeur
de la Qualité et de la Protection des Végétaux

Robert TESSIER

Annexe 2 : Elaboration de l'avis

L'avis a été élaboré par le CS du HCB.

Le CS du HCB est composé de :

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

et par ordre alphabétique des noms de famille : Claude Bagnis, Yves Bertheau, Pascal Boireau, Denis Bourguet, François-Christophe Coléno, Denis Couvet, Jean-Luc Darlix, Elie Dassa, Maryse Deguergue, Marion Desquilbet, Hubert de Verneuil, Robert Drillien, Anne Dubart-Kupperschmitt, Nathalie Eychenne, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Mireille Jacquemond, André Jestin, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Jane Lecomte, Olivier Le Gall, Didier Lereclus, Rémy Maximilien, Antoine Messéan, Nicolas Munier-Jolain, Jacques Pagès, Daniel Parzy, Catherine Regnault-Roger, Pierre Rougé, Patrick Saindrenan, Annie Sasco, Pascal Simonet, Virginie Tournay, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.

En raison de sa nomination à la Direction Générale de l'INRA, Olivier Le Gall ne participe plus aux travaux du CS du HCB depuis le 1^{er} janvier 2013¹⁸.

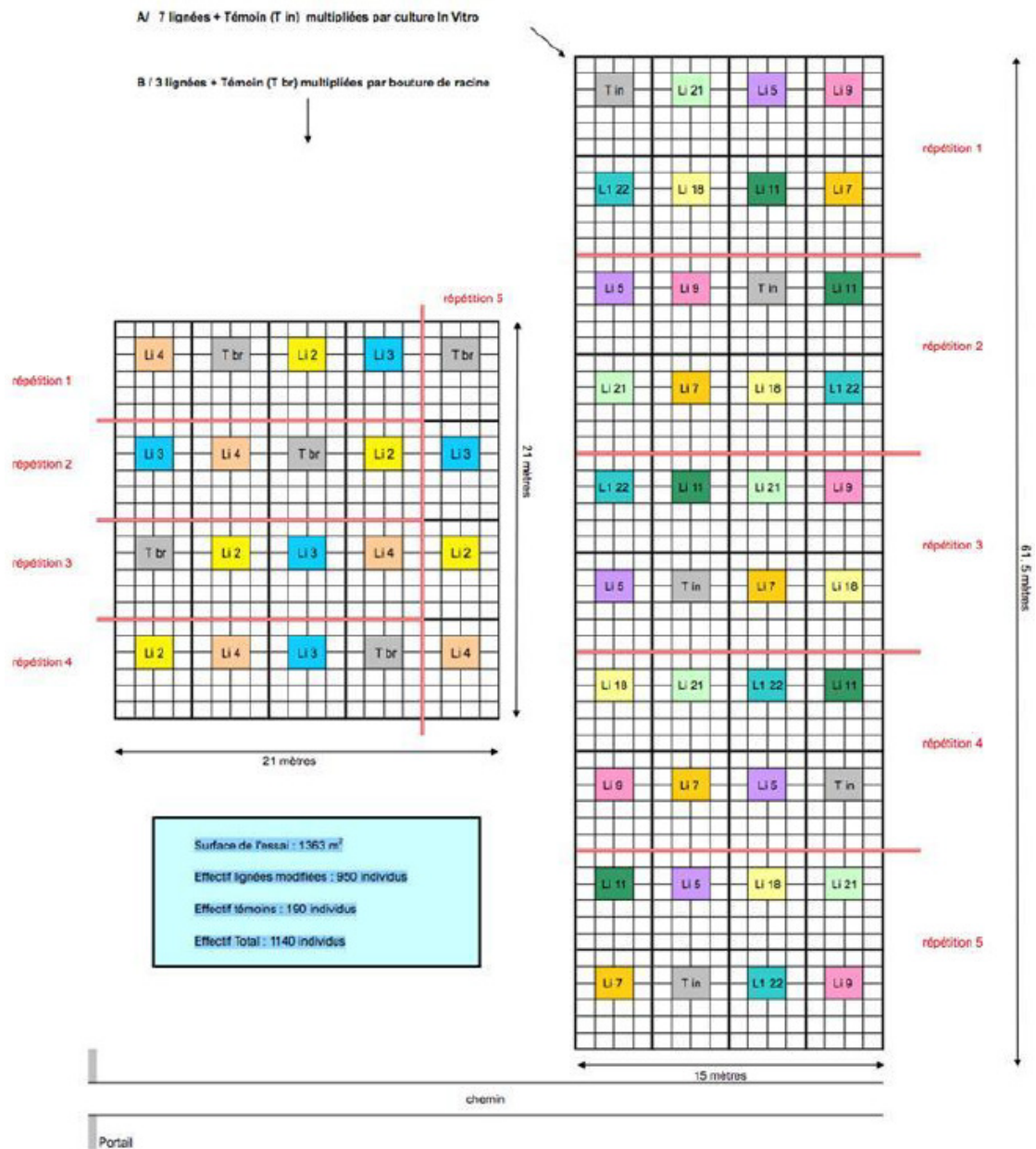
Les membres du CS du HCB remplissent annuellement une déclaration publique d'intérêts. Ils sont également interrogés avant l'examen de chaque dossier. Aucun membre du CS n'a déclaré avoir de conflits d'intérêt avec ce dossier lors de son examen en séance le 12 mars 2013.

Un rapporteur extérieur, Eric Paillassa, de l'Institut du développement forestier, a été sollicité pour compléter l'expertise du CS. M. Paillassa a signé un engagement de confidentialité, et a certifié ne pas avoir de conflits d'intérêts après avoir pris connaissance du dossier. Il a fourni une analyse du dossier dans son domaine d'expertise. Il n'a toutefois pas contribué directement à la rédaction de l'avis du CS.

La participation à l'élaboration des commentaires n'implique pas que l'avis adopté ait reçu l'assentiment plein et entier de tous les participants mais indique qu'une majorité s'est dégagée en sa faveur, dans la limite des compétences des experts et après exposé de l'ensemble des points de vue.

¹⁸ A l'occasion de cette nomination, Olivier Le Gall a présenté sa démission du CS du HCB. Cette démission prendra officiellement effet dès la nomination d'un nouvel expert en remplacement.

Annexe 3 : Dispositif expérimental



Plan du dispositif expérimental. Chaque lignée est plantée en 5 blocks de 24 individus. Les lignées non transformées sont nommées **Tbr** et **Tin**. Les lignées transgéniques sont nommées :

Li2 101 (pBIBHygro/AS-CCoAOMT)
Li3 416 (pBIBHygro/S-CCoAOMT)
Li4 429 (pBIBHygro/S-CCoAOMT)
Li5 WT52-3 (pBIBHygro/S-CCR)
Li7 WT62-13 (pBIBHygro/AS-CCR)

Li9 ASCOMT2B (pGSJ780A/AS-COMT)
Li11 ASCOMT10B (pGSJ780A/AS-COMT)
Li18 ASCAD52 (pGSJ780A/AS-CAD)
Li21 ASCAD21 (pGSJ780A/AS-CAD)
Li22 SCAD1 (pGSJ780A/S-CAD)