

**Notification préalable à la dissémination volontaire dans  
l'environnement de pommes de terre génétiquement  
modifiées porteuses d'une résistance améliorée à  
*Phytophthora infestans*  
(2007 - 2011)**

<b>Résumé des points principaux .....</b>	<b>4</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>8</b>
<b>A. Informations d'ordre général .....</b>	<b>13</b>
A.1 Nom et adresse du notifiant .....	13
A.2 Nom, qualification et expérience des scientifiques responsables.....	13
A.3. Titre du projet .....	13
A.4. Développements ultérieurs envisagés .....	13
<b>B. Informations concernant les plantes réceptrices .....</b>	<b>14</b>
B.1 Nom complet .....	14
B.2.a Informations concernant la reproduction.....	14
B.2.b Compatibilité sexuelle avec d'autres espèces sauvages ou cultivées, y compris la répartition en Europe des espèces compatibles .....	15
B.3 Capacité de survie.....	15
B.4 Dissémination .....	15
B.5 Distribution géographique de la plante.....	16
B.6 Description de l'habitat naturel de la plante (espèces ne poussant pas habituellement en UE) .....	16
B.7 Autres interactions potentielles avec des organismes dans l'écosystème habituel	16
<b>C. Informations concernant la modification génétique.....</b>	<b>18</b>
C.1 Description des méthodes utilisées pour la modification génétique .....	18
C.2 Nature et source du vecteur utilisé.....	18
C.3 Taille, origine des organismes donneurs et fonction recherchée de chaque fragment constitutif de la région envisagée pour l'insertion .....	18
<b>D. Informations concernant la plante supérieure génétiquement modifiée .....</b>	<b>22</b>
D.1 Description du ou des caractères ou des caractéristiques qui ont été introduits ou modifiés .....	22
D.2 Informations sur les séquences réellement insérées ou délétées .....	22
D.3 Informations concernant l'expression de l'insert .....	23
D.4 Description des différences entre la plante génétiquement modifiée et la plante réceptrice.....	23
D.5 Stabilité génétique de l'insert et stabilité phénotypique de la plante modifiée .....	24
D.6 Modifications de la capacité de la plante modifiée à transférer du matériel génétique dans d'autres organismes .....	24
D.7 Informations concernant les effets toxiques, allergisants ou autres effets nocifs résultant de la modification génétique sur la santé humaine .....	25
D.8 Informations concernant la sécurité de la plante modifiée pour la santé des animaux, lorsque la plante est destinée à être utilisée dans l'alimentation animale .....	26
D.9 Mécanisme d'interaction entre la plante modifiée et les organismes cibles .....	26
D.10 Modifications potentielles des interactions de la plante modifiée avec les organismes non-cibles résultant de la modification génétique .....	26
D.11 Interactions potentielles avec l'environnement abiotique.....	27
D.12 Description des méthodes de détection et d'identification de la plante supérieure génétiquement modifiée .....	27
D.13 Informations, le cas échéant, sur les précédentes disséminations de la plante génétiquement modifiée .....	27
<b>E. Informations concernant le site de dissémination .....</b>	<b>28</b>
E.1 Localisation et étendue des sites de dissémination .....	28
E.2 Description de l'écosystème des sites de dissémination .....	28
E.3 Présence d'espèces apparentées sauvages sexuellement compatibles ou d'espèces végétales cultivées sexuellement compatibles .....	28
E.4 Proximité des sites de biotopes officiellement reconnus ou de zones protégées susceptibles d'être affectées .....	28

<b>F.</b>	<b>Information concernant la dissémination.....</b>	<b>29</b>
F.1	Objectif de la dissémination .....	29
F.2	Date et durée prévues de l'opération .....	29
F.3	Méthode de dissémination envisagée .....	29
F.4	Méthode de préparation et gestion du site avant, pendant et après la dissémination, y compris les façons culturales et méthodes de récolte .....	29
F.5	Nombre approximatif de plantes .....	30
<b>G.</b>	<b>Information sur les plans de surveillance, de contrôle et de traitement du site et des déchets après dissémination .....</b>	<b>31</b>
G.1	Précautions prises .....	31
G.2	Description des méthodes de traitement du site après dissémination.....	31
G.3	Description des méthodes de traitement après dissémination pour le matériel issu de plantes génétiquement modifiées, y compris les déchets.....	32
G.4	Description des plans et techniques de surveillance .....	33
G.5	Description des plans d'urgence .....	35
G.6	Méthodes et procédures de protection du site .....	35
<b>H.</b>	<b>Conclusions concernant les incidences potentielles sur l'environnement de la dissémination .....</b>	<b>36</b>
H.1.	Probabilité que les plantes modifiées deviennent plus persistantes que les plantes parentales ou réceptrices dans les habitats agricoles ou se propagent plus rapidement dans les habitats naturels .....	36
H.2.	Avantages ou inconvénients sélectifs conférés à la plante modifiée .....	36
H.3.	Possibilité de transfert de gènes aux mêmes espèces ou à d'autres espèces végétales sexuellement compatibles dans les conditions de plantation des plantes modifiées et avantages ou inconvénients sélectifs conférés à ces espèces végétales .....	37
H.4.	Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les plantes modifiées et les organismes cibles, tels que prédateurs, parasitoïdes et agents pathogènes peuvent avoir sur l'environnement.....	37
H.5.	Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les plantes modifiées et des organismes non-cibles peuvent avoir, notamment les incidences sur les niveaux de population des concurrents, herbivores, symbiotes, parasites et agents pathogènes.....	37
H.6.	Effets immédiats et/ou différés éventuels sur la santé humaine résultant des interactions directes ou indirectes potentielles entre les plantes modifiées et les personnes travaillant ou entrant en contact avec la ou les plantes modifiées disséminées ou se trouvant à proximité .....	38
H.7.	Effets immédiats et/ou différés éventuels sur la santé des animaux et conséquences pour la chaîne alimentaire résultant de la consommation de la plante modifiée ou de tout produit dérivé s'il est destiné à être utilisé en tant qu'aliment pour animaux .....	38
H.8.	Incidences immédiates et/ou différées sur les processus biogéochimiques résultant des interactions directes et indirectes potentielles de la plante modifiée et des organismes cibles et non-cibles à proximité du ou des OGM disséminés.....	39
H.9.	Incidences immédiates et/ou différées, directes ou indirectes, que les techniques spécifiques de culture, de gestion et de récolte utilisées pour les plantes modifiées peuvent avoir sur l'environnement lorsqu'elles sont différentes de celles utilisées pour des plantes supérieures non génétiquement modifiées .....	39
I.	Références bibliographiques.....	45
ANNEXE 1:	Liste des lignées actuellement disponibles qui seront envisagées pour la dissémination proposée .....	49
ANNEXE 2:	Disposition proposée pour la parcelle d'essais .....	70
ANNEXE 3:	Information confidentielle .....	71

## RESUME DES POINTS PRINCIPAUX

### Notifiant

BASF Plant Science GmbH

### Titre

Notification préalable à la dissémination volontaire dans l'environnement de pommes de terre génétiquement modifiées porteuses d'une résistance améliorée à *Phytophthora infestans*.

### Objectif de la transformation

Les gènes portant la résistance améliorée à *P. infestans* sont des gènes de résistance provenant de *Solanum bulbocastanum*. Les gènes de résistance peuvent être répartis entre différentes classes, avec la plus grande partie relevant de la classe des NBS (*site de liaison des nucléotides*) -LRR (*région riche en leucine*). Les gènes *Rpi-blb1* et *Rpi-blb2* appartiennent tous deux à la classe de gènes de résistance NBS-LRR. Les plasmides VCPMA16 et VCPMA19 contiennent chacun des fragments génomiques venant de *S. bulbocastanum* et contenant les gènes *Rpi-blb1* et *Rpi-blb2* en même temps que leurs régions promotrice et terminatrice endogènes.

Le gène codant l'acétohydroxyacide synthase (*ahas*) est originaire d'*Arabidopsis thaliana* et présente une mutation ponctuelle correspondant à S653N dans la protéine AHAS exprimée. La mutation ponctuelle a pour conséquence une protéine qui confère aux tissus végétaux en culture une résistance aux herbicides de la famille des imidazolinones, et permet donc de sélectionner les tissus génétiquement transformés. Aucune résistance aux herbicides à l'imidazolinone n'est prévue dans les conditions naturelles

### Espèce végétale réceptrice

*Solanum tuberosum*

### Gène(s) d'intérêt introduit(s) et séquences de contrôle

Le gène *Rpi-blb2* de *S. bulbocastanum* avec ses régions promotrice et terminatrice endogènes.

Le gène *Rpi-blb1* de *S. bulbocastanum* avec ses régions promotrice et terminatrice endogènes.

Le fragment de VCPMA19 correspondant au *Rpi-blb1* de *S. bulbocastanum* est plus long que son homologue de VCPMA16 en raison de la longueur plus importante de ses régions tant promotrice que terminatrice.

Le gène de l'acétohydroxyacide synthase (*ahas*) originaire d'*Arabidopsis thaliana* avec les séquences promotrice et terminatrice du gène de la nopaline synthase originaire (nos) d'*A. tumefaciens*.

## Durée du projet

Il est prévu de procéder à la dissémination des lignées de pommes de terre génétiquement modifiées du mois d'avril jusqu'au mois d'octobre des années 2007 à 2011, la plantation intervenant au plus tôt en avril et au plus tard en juin, et la récolte en septembre-octobre de la même année.

## Localisation des disséminations

Implantation potentielle dans les régions suivantes :

- Commune 02390 Mont d'Origny
- Commune 02410 Septvaux
- Commune 62161 Duisans
- Commune 62217 Tilloy lès Mofflaines

Les sites de Septvaux et de Duisans sont destinés à être utilisés dès 2007. Le site de Mont d'Origny et Tilloy lès Mofflaines sera incorporé au réseau d'expérimentation en 2008.

## Précautions envisagées

Une distance d'isolation de 10 m sera observée par rapport aux autres variétés de pommes de terre. Le matériel servant à la plantation et à la récolte sera nettoyé sur site pour éviter la dispersion de tubercules transgéniques. Il n'y aura aucune culture de pommes de terre sur le site de dissémination au cours de l'année suivant la dissémination. L'apparition de repousses éventuels fera l'objet d'une surveillance et ces repousses seront éliminés en accord avec les façons culturales conventionnelles. Le site expérimental sera inspecté à intervalles réguliers tout au long de l'expérience.

## Résumé des expériences antérieures (faits marquants)

Des lignées de pommes de terre génétiquement modifiées portant les gènes *Rpi-blb1* et *Rpi-blb2* ont été disséminées en plein champ en 2006 en Suède (agrément n° B/SE/05/8615), aux Pays-Bas (agrément n° B/NL/05/03) ainsi qu'en Allemagne (agrément no. B/DE/05/174).

## État de développement

Les essais sont mis en oeuvre dans le cadre d'un programme de mise au point de variétés de pommes de terre présentant une résistance accrue à *Phytophthora infestans*. Aucune demande d'autorisation de mise sur le marché de ces lignées de pommes de terre n'a été soumise à ce jour.

## Objectif de la dissémination

Les essais ont pour objet la recherche appliquée. Au cours des trois ou quatre années initiales, des cultures expérimentales à petite échelle serviront à sélectionner les événements selon le critère de résistance améliorée à *Phytophthora infestans* (confirmation du concept dans les conditions de terrain spécifiques à la France et avec des souches de *Phytophthora infestans* spécifiques à la France). De plus, pendant les essais, il sera procédé à l'observation et à l'enregistrement des éléments suivants: performance agronomique (p. ex. vigueur et rendement de la plante), et diverses caractéristiques de la plante (p. ex. levée, floraison, maturation), ainsi que la stabilité

du caractère introduit. Par ailleurs, au cours de la dernière ou des deux dernières années des essais, il sera procédé, dans le contexte de la recherche portant sur l'évaluation du risque, à la collecte de données relatives à diverses lignées de pommes de terre résistantes à *Phytophthora* et à leur comparaison avec des lignées réceptrices non modifiées, ou avec des variétés conventionnelles de pomme de terre. Ceci portera sur les questions de gestion des repousses, de stabilité de l'expression (p. ex. prélèvement de tissus à divers stades de développement pour examiner l'expression des gènes introduits), de possibilité d'effets sur les insectes associés à la pomme de terre, et de possibilité de changements de ses propriétés qualitatives (p. ex. la qualité du tubercule). Le matériel végétal recueilli servira à diverses analyses (y compris des tests faisant appel à la biologie moléculaire et à la biochimie). Les tubercules pourront, le cas échéant, être utilisés pour fournir des plants pour la saison suivante.

L'objectif à long terme est la mise au point de variétés de pomme de terre présentant une résistance améliorée à *P. infestans*.

### **Nombre et surface des essais**

La densité de plantation respectera les façons culturales conventionnelles, avec un nombre maximum de 45.000 tubercules par site et par an. En conséquence, la première année, le nombre de plantes par lignée transgénique ne dépassera pas 500 par emplacement. Au cours des années suivantes le nombre de lignées transgéniques utilisées diminuera, tandis que la surface plantée annuellement pour chaque lignée plafonnera à 1 ha.

### **Conclusions concernant les incidences potentielles sur l'environnement de la dissémination**

Les lignées génétiquement modifiées de pommes de terre comportent deux gènes NBS-LRR, *Rpi-blb1* et *Rpi-blb2*, originaires de *S. bulbocastanum* et destinés à leur conférer une résistance améliorée à *P. infestans*. De nombreuses variétés conventionnelles de pommes de terre comportent également des gènes NBS-LRR qui ont été introgressés à partir d'espèces sauvages de *Solanum*. Un effet recherché du caractère ainsi introduit est une meilleure survivabilité dans les champs exposés à *P. infestans*. L'avantage sélectif qui pourrait en découler, cependant, n'a d'incidence pratique que dans le cadre des cultures agricoles, et n'améliorera pas la survivabilité de la plante dans le milieu naturel environnant. La diminution des quantités de fongicides nécessaires pour ces lignées peut aisément être considérée comme un bénéfice pour l'environnement.

Le gène *ahas* exprimé par les plants de pommes de terre confère aux pousses, durant le processus de sélection sous culture tissulaire, une tolérance au principe actif herbicide de l'imazamox. Il n'en résulte aucun avantage sélectif en plein champ, puisque les herbicides à l'imidazolinone ne sont pas homologués en France pour le traitement des cultures, et qu'aucune tolérance des plantes traitées n'est prévue dans les conditions de terrain. Il n'est prévu aucune différence par rapport aux variétés conventionnelles de pommes de terre en ce qui concerne la persistance des lignées transgéniques dans les habitats agricoles, ou leur capacité de coloniser les habitats naturels. En raison des mesures de précaution prises lors de la dissémination, assurant l'éloignement ou l'absence de pommes de terre sous culture conventionnelle ou d'espèces sauvages, le risque de transfert génétique est en pratique écarté. Même au cas, hautement improbable, où des pollinisations interviendraient avec des plants non génétiquement modifiés, il n'en résulterait aucune conséquence puisque la multiplication de la pomme de terre se fait normalement par les tubercules et non par

les graines. Les interactions entre les lignées de pommes de terre génétiquement modifiées et les organismes non-cibles, et les effets éventuels de ces interactions, seront de même nature que ceux relatifs aux variétés conventionnelles de pommes de terre. De plus, il n'est prévu aucun effet toxique ou allergène provenant de l'amélioration de la résistance à *P. infestans* ou de l'expression de la protéine AHAS. On ne prévoit, sur les processus biogéochimiques, aucun autre effet que ceux qui concernent également les variétés de pommes de terre conventionnelles.

## Introduction

### Introduction à la maladie du mildiou tardif de la pomme de terre

L'oomycète *Phytophthora infestans*, l'agent causal du mildiou tardif, reste le principal pathogène dans les plus grandes régions productrices de pommes de terre au monde. Il peut détruire des récoltes en quelques semaines si les conditions météorologiques sont favorables au démarrage et à la propagation de l'épidémie. Le monde occidental a pris conscience du *Phytophthora infestans* lors des épidémies dévastatrices de mildiou tardif dans le nord-est des Etats-Unis et de l'Europe dans les années 1840 (Bourke, 1993.). La famine irlandaise de la pomme de terre est le résultat bien connu de ces premières épidémies. Alors que de nombreux scientifiques estiment que la première confrontation entre la pomme de terre et le *Phytophthora infestans* eut lieu au milieu du 19<sup>ème</sup> siècle, d'autres supposent que le mildiou tardif est apparu en Amérique du sud avant son apparition en Europe et aux Etats-Unis (Andriveau, 1996). Les pommes de terre (*Solanum tuberosum*) sont originaires de la Cordillère des Andes en Amérique du sud (Hawkes, 1945). Les scientifiques dans leur majorité considèrent que les montagnes du centre du Mexique sont le centre d'origine du *Phytophthora infestans* et que cette région a été la source originelle de toutes les migrations connues (Fry et al., 1992).



Illustration n°1, tubercule infectée

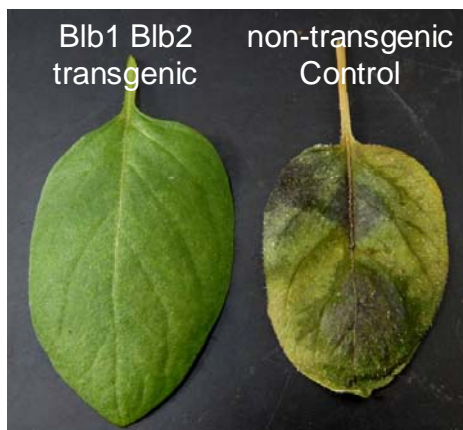


Illustration n°2, feuille infectée



## Les migrations récentes

150 ans après la première apparition du mildiou tardif aux Etats-Unis et en Europe, de nouvelles migrations apparaissent et il est logique de se demander pourquoi aucune trace de migration n'existe entre le milieu du 19<sup>ème</sup> siècle et la fin du 20<sup>ème</sup> siècle. Les causes sont multiples : déserts et océans limitaient la diffusion naturelle du *Phytophthora infestans*, transports rapides à longue distance de personnes et de marchandises étaient restreints jusqu'à une date récente, production de pommes de terre dans le centre du Mexique limitée avec un commerce international limité des pommes de terre mexicaines jusqu'à la fin du 20<sup>ème</sup> siècle et, enfin, commerce international de tomates limité entre le Mexique et les autres pays jusqu'à la fin du 20<sup>ème</sup> siècle. Les tubercules de pommes de terre infectées représentent certainement le vecteur de transport à longue distance le plus efficace pour le *Phytophthora infestans*, et la culture des pommes de terre est devenue beaucoup plus importante au Mexique à la fin du 20<sup>ème</sup> siècle. Ainsi, il y a aujourd'hui de grandes chances que les pommes de terre infectées soient produites au Mexique. A la fin des années 1970, le transport de pommes de terre a certainement été le moyen par lequel une population exotique a été introduite en Europe (Niederhauser, 1991). Alors que les Etats-Unis n'importent pas de pommes de terre du Mexique, les importations de tomates sont importantes et les tomates infectées peuvent facilement être acheminées par transport aérien.

Les premiers signes de changement dans la population européenne de *Phytophthora infestans* ont été rapportés par Hohl et Iselin en 1984 (Hohl et Iselin, 1984). Ils trouvèrent en Suisse des isolats avec le type sexué A2. Ce rapport effraya les scientifiques du monde entier car selon le dogme en vigueur tous les isolats hors du Mexique étaient de type sexué A1. Ce rapport fut suivi de nombreux autres, en provenance tout d'abord d'Europe, puis successivement de nombreux autres lieux, confirmant l'apparition d'isolats de type sexué A2 et ce dès 1980 (Fry et al., 1993). Il semble maintenant probable qu'il y ait eu des migrations secondaires d'Europe vers l'Amérique du sud (Forbes et al., 1997).

## La biologie du *Phytophthora infestans*

Il fait partie des ~70 espèces de *Phytophthora* considérées comme les pathogènes potentiellement les plus destructeurs des plantes dicotylédones. D'autres espèces de *Phytophthora* économiquement importantes sont le *Phytophthora sojae* qui provoque la pourriture des racines chez le soja, le *Phytophthora palmivora* qui provoque la pourriture brune du cacaoyer, le *Phytophthora cinnamomi* qui provoque la pourriture des racines et de la tige chez ~2000 espèces de plantes; et le *Phytophthora ramorum* récemment identifié qui dévaste les chênes aux Etats-Unis et dans toute l'Europe (Andrison, 1996). Bien que dotés d'une croissance filamenteuse similaire à celle des champignons, ils sont de la famille de l'algue brune (Bourke, 1993). Alors que la pathogénicité fongique a été intensément étudiée, on ne dispose que de peu d'informations sur la génétique moléculaire de la pathogénicité de l'oomycète ou sur les molécules pathogènes qui sont reconnues par les défenses de l'hôte (Andrison, 1996).

Les oomycètes sont un groupe d'organismes qui ne font partie ni des vrais champignons, ni des plantes ni des animaux (Dick, 1995). Ce groupe d'organismes se caractérise par l'absence de chitine dans la paroi cellulaire (les vrais champignons contiennent de la chitine), de zoospores produits dans la sporange, de noyaux diploïdes dans les cellules végétatives et une reproduction sexuée. Le genre *Phytophthora* comprend certaines espèces (dont le *Phytophthora infestans*) hétérothalliques (types sexués A1 et A2) et d'autres homothalliques. Les parents

phylogénétiques les plus proches des oomycètes comprennent certaines algues. Le concept selon lequel les oomycètes ne font pas partie de la famille des vrais champignons (Erwin et Ribeiro, 1996) s'est imposé progressivement au cours des 30 dernières années. La gestion de la maladie dans les pays développés se base actuellement sur l'utilisation de fongicides. La vaporisation saisonnière fréquente de fongicides est très coûteuse pour l'exploitant agricole et nuit à l'environnement. Elle pousse par ailleurs le pathogène à développer des résistances aux matières actives employés pour appliqués les cultures.

### Amélioration génétique de la résistance

Au cours du 20<sup>ème</sup> siècle, l'amélioration génétique de nouveaux cultivars de pommes de terre ayant un niveau élevé de résistance durable au *Phytophthora infestans* a été envisagée comme une alternative à l'emploi de fongicides. Les sélectionneurs ont introgressé les gènes de résistance dominants *R1*, *R2*, *R3*, *R4* et *R10* des espèces de pommes de terre sauvages *Solanum demissum* chez les cultivars mais des races du pathogène capables de contourner ces gènes sont apparus en l'espace de quelques années après leur mise en marché (Turkensteen, 1993). A la fin des années 1950, la majorité des sélectionneurs sont passés à l'utilisation de germoplasme avec une résistance générale également appelée résistance au champ, partielle ou quantitative (Hawkes, 1978). Le paradigme sous-jacent étant que ce type de résistance est indépendant du gène de résistance et on présume qu'il est plus durable que la résistance basée sur des gènes de résistance monogénétique héréditaire (Turkensteen, 1993). L'objectif de certains sélectionneurs est maintenant d'identifier d'autres gènes de forte résistance conférant un large spectre de résistance au mildiou tardif et de les introgresser chez des variétés modernes de pommes de terre.

Un certain nombre de gènes de résistance fonctionnelle de pommes de terre sont en cours de clonage. Ils appartiennent tous à la classe NBS-LRR des gènes de résistance des plantes. Trois d'entre eux confèrent une résistance au mildiou tardif. Les gènes *R1* et *R3a* sur les chromosomes 5 et 11 respectivement, issus de *Solanum demissum*, confèrent une résistance spécifique à la race, alors que les gènes *Rpi-blb1* et *Rp-blb2* des espèces de pommes de terre sauvages *Solanum bulbocastanum* confèrent des hauts niveaux de résistance à une série d'isolats de *Phytophthora infestans* avec des structures de race complexes.

La classe la plus abondante de gènes de résistance caractérisés, comprenant ~0,5% des gènes prédits dans le génome d'*Arabidopsis* (Meyers *et al.*, 2002), est sensée coder les protéines intracellulaires porteuses des domaines des répétitions riches en leucines (LRR) et du site de liaison nucléotidique (NBS), motifs qui se retrouvent également dans d'autres protéines réceptrices et de transduction du signal.

Selon l'hypothèse « gène pour gène » (Flor, 1971), la résistance à la maladie suit la perception des molécules pathogènes effectrices ayant une fonction avirulente (*Avr*) grâce aux protéines de résistance des plantes. Ainsi, grâce à un complexe éliciteur de reconnaissance, elles amorcent des passages de transduction du signal entraînant une réponse hypersensible (Dangl *et al.*, 1996). En général, on considère que les protéines de résistance NBS-LRR ont, tout comme d'autres récepteurs, une structure modulaire avec une reconnaissance et des domaines de signalisation séparés, ce qui fait que le LRR est le domaine de reconnaissance du candidat et la région N-terminale incluant le NBS est le domaine principal de la signalisation.

## Le *Solanum bulbocastanum* comme nouvelle source de résistance

Le *Solanum bulbocastanum* diploïde du Mexique et du Guatemala est l'une des espèces tubérifères réputée pour son niveau élevé de résistance au mildiou tardif (Niederhauser et Mills, 1953). Malheureusement, le transfert classique de résistance des espèces sauvages de *Solanum* aux pommes de terre de culture est souvent empêché par des différences de ploïdie et d'EBN (Endosperm Balance Number). Malgré ces problèmes, l'introgession de la caractéristique de résistance du *Solanum bulbocastanum* a réussi. Les manipulations de la ploïdie et une longue série de croisements ont abouti à un germoplasme résistant au *Phytophthora infestans* dérivé du *Solanum bulbocastanum* (Hermsen et Ramanna, 1973). Toutefois, 40 ans d'efforts intenses d'amélioration génétique avec ce germoplasme n'ont toujours pas débouché sur une commercialisation de cultivars résistants. Plus récemment, des hybrides somatiques de *Solanum bulbocastanum* et de *Solanum tuberosum* ainsi que de germoplasmes rétro-croisés se sont avérés hautement résistants au mildiou tardif même sous une pression intense de la maladie (Helgeson *et al.*, 1998). Toutefois, la suppression de la recombinaison dans ce produit pourrait constituer un obstacle potentiel à une reconstitution réussie des germoplasmes récurrents de pommes de terre de culture à un niveau correspondant aux normes des cultivars de pommes de terre nouvellement sélectionnés (Helgeson *et al.*, 1998). L'isolement des gènes codant les caractéristiques de résistance trouvés dans les sources sauvages et les transformations des cultivars commerciaux avec ces gènes pourrait représenter un moyen beaucoup plus rapide d'exploiter une résistance potentiellement durable au mildiou tardif dans les espèces *Solanum* sauvages.

Un gène de résistance de plante de type CC-NBS-LRR, appelé *Rpi-blb1*, et dérivé du *Solanum bulbocastanum* a été isolé par clonage positionnel. Le *Rpi-blb1* confère une résistance complète à une série d'isolats *Phytophthora infestans* porteurs de multiples facteurs de virulence et la spécificité de la race n'a pas encore été démontrée (van der Vossen *et al.*, 2003). Etant donné qu'il manque à cette classe de gènes de résistance des segments transmembranaires prévus ou des peptides signal, la perception des produits *Avr* se fait probablement dans le cytoplasme. L'interprétation la plus directe de la reconnaissance de l'éliciteur à médiation du gène de résistance évoque une interaction intermoléculaire directe. Les niveaux extraordinairement élevés de divergence synonyme parmi les paralogues de l'haplotype *Rpi-blb* reflètent la longévité du cluster de gène *Rpi-blb* et par conséquent l'occurrence possible de la sélection par bascule sur ce locus dans les populations naturelles *Solanum bulbocastanum*. Une preuve encore plus palpable d'une sélection par bascule est le polymorphisme pour la présence ou l'absence de gène complet dans les différents haplotypes. Cela impliquerait une contribution relative élevée du gène *Avr* correspondant à la virulence du *Phytophthora infestans* (van der Vossen *et al.*, 2003). Ceci est en conformité avec le large spectre de résistance conféré par le *Rpi-blb* et l'observation selon laquelle les changements de substitution d'acide aminé ne se sont pas accumulés plus rapidement que les changements similaires dans ces régions du gène qui, dans des gènes de résistance attentivement étudiés, ont été identifiés comme étant les déterminants majeurs de la reconnaissance de la spécificité des facteurs *Avr* (Ellis *et al.*, 2000).

Le transfert de sa résistance au pool de gènes de pommes de terre cultivées a été réussi grâce à la longue et fastidieuse application de schémas d'amélioration génétique comprenant des manipulations de la ploïdie et des séries de croisements interspécifiques. Les hybrides interspécifiques résistants au *Phytophthora infestans* qui en résultent ont été appelés ABPT (Hermsen et Ramanna, 1973). Le phénotype de résistance et l'analyse subséquente des marqueurs du germoplasme dérivé de l'ABPT nous ont amené à conclure qu'un locus conférant une résistance au mildiou tardif dans ces espèces hybrides était présent sur le chromosome 6, indiquant

l'existence d'un second gène *Rpi* dans le *Solanum bulbocastanum* qui fut désigné *Rpi-blb2*. Le gène *Rpi-blb2* est capable de compléter le phénotype sensible à la fois chez les tomates et les pommes de terre cultivées. La protéine *Rpi-blb2* partage 82% d'identité séquentielle avec la protéine *Mi-1* qui confère à la tomate la résistance aux trois espèces de nématodes provoquant la nodosité des racines ainsi qu'au puceron vert et rose de la pomme de terre, le *Macrosiphum euphorbiae*, ainsi qu'aux deux biotypes B et Q de la mouche blanche *Bemisia tabaci* (van der Vossen et al., 2005).

### Objectif des essais au champ

Deux gènes d'amélioration de la résistance au *Phytophthora infestans* du *Solanum bulbocastanum* ont été transférés à des variétés conventionnelles de pommes de terre par la transformation de plantes. Les plasmides VCPMA16 et VCPMA19 contiennent tous les deux fragments génomiques de *Solanum bulbocastanum* contenant les gènes de *Rpi-blb2* et de *Rpi-blb1* avec leur promoteur endogène et leurs régions terminatrices. Des essais au champ prévus vont être menés pour sélectionner les lignées de pommes de terre génétiquement modifiées pour l'amélioration de la résistance au *Phytophthora infestans* dans des conditions correspondant aux champs français avec des souches spécifiques françaises de *Phytophthora infestans*. L'objectif à long terme est de développer des pommes de terre ayant une résistance améliorée au *Phytophthora infestans*. En 2006, les lignées de pommes de terre génétiquement modifiées ont déjà été testées avec succès sur champs aux Pays-Bas, en Suède et en Allemagne et ont été exposées aux souches locales de *Phytophthora infestans* avec des résultats remarquables. Les deux gènes *Rpi-blb2* et *Rpi-blb1* de la pomme de terre sauvage *Solanum bulbocastanum* confèrent une résistance accrue aux lignées de pommes de terre génétiquement modifiées comme le montrent les chiffres ci-dessous.



Illustration n°3. Lignées de pommes de terre génétiquement modifiées inoculées aux races de *Phytophthora infestans* locales aux Pays-Bas et en Suède comparées aux pommes de terre conventionnelles apparentées.

## A. Informations d'ordre général

### A.1 Nom et adresse du notifiant

Notifiant:

BASF Plant Science GmbH  
Carl-Bosch-Str. 38  
D-67056 Ludwigshafen  
Allemagne

Contact pour les questions de réglementation:

Cette information est donné en annexe confidentiel.

### A.2 Nom, qualification et expérience des scientifiques responsables

Cette information est donné en annexe confidentiel.

### A.3. Titre du projet

Notification préalable à la dissémination volontaire dans l'environnement de pommes de terre génétiquement modifiées porteuses d'une résistance améliorée à *Phytophthora infestans*.

### A.4. Développements ultérieurs envisagés

Les essais en plein champ sont destinés à la sélection de pommes de terre génétiquement modifiées porteuses d'une résistance améliorée à *Phytophthora infestans* dans les conditions de terrain de la France, face à des races de *P. infestans* spécifiques à la France.

L'objectif à long terme est la mise au point de pommes de terre montrant une résistance améliorée à *P. infestans*.

## B. Informations concernant les plantes réceptrices

### B.1 Nom complet

Famille: *Solanaceae*  
 Genre: *Solanum*  
 Espèce: *tuberosum*  
 Sous-espèce: *tuberosum*  
 Cultivar: P698, P835, P880  
 Nom courant: pomme de terre

Propriétés des variétés	P698	P835	P880
Maturité	Demi-tardive	Moyenne	Moyenne
Port de plante	Intermédiaire	Intermédiaire	Dressé
Couleur de fleur	Blanche	Blanche	Blanche
Fréquence de fleurs	Moyenne	Abondante	Abondante
Fructification	Rare	Parfois	Fréquente
Forme de tubercule	Oblongue allongée	Oblongue allongée	Oblongue allongée
Couleur de la peau	Jaune	Jaune	Jaune

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

#### (a) Mode de reproduction

La reproduction de la pomme de terre se fait essentiellement par voie végétative, au moyen des tubercules, bien que la reproduction sexuée par graines soit possible. Dans les conditions du terrain l'autogamie est le mode dominant, avec 80% à 100% des graines formées par autogamie.

#### (b) Le cas échéant, facteurs spécifiques affectant la reproduction

La survie de la pomme de terre se fait sous forme de tubercules ou de graines. Dans la mesure où les tubercules sont en général sensibles au gel, leur survie et leur reproduction dépendent de la température. Une température de -3°C ou inférieure est fatale au tubercule. Il a été rapporté que les tubercules de pomme de terre succombent au froid à l'issue d'une période de gel de 25 heures à -2°C ou de cinq heures à -10°C (OECD, 1997).

#### (c) Temps de génération

Le temps de génération de la pomme de terre dans les conditions de culture européennes est de un an.

### B.2.b Compatibilité sexuelle avec d'autres espèces sauvages ou cultivées, y compris la répartition en Europe des espèces compatibles

*Solanum tuberosum* est compatible avec les autres génotypes de la même espèce cultivés en Europe. *Solanum tuberosum* n'est pas compatible avec les espèces sauvages européennes apparentées *Solanum dulcamara* (Douce-amère) et *Solanum nigrum* (Morelle noire) (Eijlander et Stiekema, 1994; Raybould et Gray, 1993; McPartlan et Dale, 1994). Il ne se forme pas de plantes ou de graines viables (OECD, 1997).

### B.3 Capacité de survie

#### (a) Capacité à former des structures de survie ou de dormance

Dans son biotope d'origine (Amérique du Sud) la pomme de terre est une plante pérenne, mais en Europe c'est une culture annuelle. La survie se fait sous forme de tubercules ou de graines.

#### (b) Le cas échéant, facteurs spécifiques affectant la capacité de survie

Dans la mesure où les tubercules sont en général sensibles au gel, leur capacité de survie et de reproduction dépend de la température. Une température de -3°C ou inférieure est fatale au tubercule. Il a été rapporté que les tubercules de pomme de terre succombent au froid à l'issue d'une période de gel de 25 heures à -2°C ou de cinq heures à -10°C (OECD, 1997). Dans les conditions européennes, les tubercules résistent mal dans des sols froids et humides, et les plantes sont rapidement affectées par diverses maladies virales et fongiques (Eastham et Sweet, 2002). La survivabilité est également limitée par des façons culturales telles que labour, hersage et mise en oeuvre d'herbicides, ainsi que par la concurrence des autres espèces cultivées du même cycle de rotation culturale. La graine résiste à l'hiver quelle que soit la température. Dans les conditions de terrain, les fructifications n'arrivent en principe pas à maturité. En raison du statut génétique d'hétérozygote tétraploïde des pommes de terre cultivées en Europe, la formation des graines donne lieu à un degré élevé de ségrégation génétique. Les plantes issues le cas échéant de ces graines se développent plus que faiblement, avec de mauvais résultats agronomiques et une compétitivité réduite. Leur survie varie en fonction des façons culturales et des rotations mises en oeuvre. Les repousses sont éliminées par labour, hersage, traitement aux herbicides et rotation des cultures.

### B.4 Dissémination

#### (a) Forme et étendue de la dissémination

La dissémination des pommes de terre se fait par les tubercules, les graines et le pollen. La dissémination des tubercules et des graines n'outrepasse pas, normalement, les limites de la zone mise en culture.

#### (b) Le cas échéant, facteurs spécifiques affectant la dissémination

La dissémination par tubercules et graines est essentiellement d'origine humaine (transport, manipulation, façons culturales). Les animaux, et en particulier les oiseaux de grande taille, peuvent également y avoir une part limitée. Cependant, ce dernier type de dissémination, en ce qui concerne les

graines, est en pratique à exclure, dans la mesure où les graines sont contenues dans des baies hautement toxiques.

La dissémination pollinique, quand elle est possible (de nombreuses variétés étant stériles), se fait presque exclusivement par les insectes. Cette dissémination est limitée à un rayon de 5 à 10 m (Bock et al., 2002). La dissémination par le vent est considérée comme négligeable (OECD, 1997; Eastham et Sweet, 2002). Dans les conditions du terrain, l'autogamie est le résultat le plus probable, avec 80% à 100% des graines formées par autogamie.

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

La pomme de terre est originaire de la région andine de l'Amérique du Sud, où elle est cultivée depuis plusieurs millénaires. Il s'agit d'une des cultures les plus importantes à l'échelle mondiale et elle est cultivée dans toute l'Europe. On ne trouve la pomme de terre que dans le contexte de l'écosystème agricole.

#### B.6 Description de l'habitat naturel de la plante (espèces ne poussant pas habituellement en UE)

Non applicable.

#### B.7 Autres interactions potentielles avec des organismes dans l'écosystème habituel

Les insectes comme les pucerons (*Myzus persicae*, *Aphis nasturtii*, *A. frangulae* et autres), les cicadelles (*Empoasca* spp) et le doryphore (*Leptinotarsa decemlineata*) sont des parasites bien connus des cultures européennes de pomme de terre, ainsi que les nématodes (*Globodera* spp, *Ditylencus* spp, *Paraditylencus* spp, *Tricodorus* spp et *Paratricodorus* spp).

Comme pour les autres plantes, il existe une vaste liste de microorganismes, de virus et de viroïdes qui présentent des interactions avec la plante de pomme de terre. Parmi les pathologies fongiques les plus connues on citera le mildiou (*Phytophthora infestans*), le rhizoctone brun (*Rhizoctonia solanii*), la galle verruqueuse (*Synchytrium endobioticum*), l'alternariose (*Alternaria solani*), la galle poudreuse (*Spongospora subterranea*), l'oosporiose (*Polyscytalum pustulans*), la galle argentée (*Helminthosporium solani*), la moisissure grise (*Botrytis cinerea*), la pourriture aqueuse (*Pythium ultimum*), la verticilliose (*Verticillium* spp) et les gangrènes à l'entreposage (*Phoma foveata* et *Fusarium* spp).

Parmi les pathologies bactériennes, les plus répandues sont la jambe noire (*Erwinia carotovora* ssp *carotovora*, *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica*, et *Erwinia chrysanthemi*) et la galle commune (*Streptomyces scabies*), tandis qu'en Europe le flétrissement bactérien (*Pseudomonas solanacearum*) et la pourriture annulaire (*Corynebacterium sepedonicum*) sont des motifs de quarantaine.

Le plant de pomme de terre est sujet à de nombreuses attaques virales. Les virus les plus importants en termes économiques sont le *Virus de l'enroulement de la pomme de terre* (PLRV), le *Virus Y de la pomme de terre* (PVY), le *Virus A de la pomme de terre* (PVA), le *Virus X de la pomme de terre* (PVX), le *Virus S de la pomme de terre* (PVS), le *Virus M de la pomme de terre* (PVM), le *Virus du bruissement du tabac* (TRV) et le *Virus du sommet touffu de la pomme de*



*terre* (PMTV). En ce qui concerne les viroïdes, le plus important est le *Viroïde des tubercules de pomme de terre en fuseau* (PSTVd).

La pomme de terre constitue un élément important du régime alimentaire dans une grande partie du monde. Le tubercule est la seule partie de la plante à être consommée. Les principales substances toxiques ou antinutritionnelles de la pomme de terre sont les glucoalcaloïdes et les nitrates. Toxiques à haute dose, les glucoalcaloïdes se trouvent en concentration dangereuse principalement dans les tiges aériennes, les feuilles et les fruits. Leur concentration dans les tubercules des variétés cultivées de pomme de terre est en général minime, inférieure à 100 mg par kilogramme de poids humide. La concentration maximum de glucoalcaloïdes dans les pommes de terre de table a été fixée à 200 mg par kilogramme de poids humide (OECD, 1997). On trouvera les plus fortes concentrations dans les inflorescences et les bourgeons; dans les tubercules elles se trouvent généralement au niveau de la peau et des couches superficielles de la chair.

Les nitrates sont présents dans l'ensemble de la plante et sont considérés comme antinutritionnels, surtout pour le premier âge. C'est pourquoi les sélectionneurs veillent à en conserver des concentrations minimales dans les nouvelles variétés de pomme de terre.

Enfin les pommes de terre constituent une source importante d'alimentation animale dans le monde. Il arrive que des animaux sauvages, mammifères ou oiseaux, consomment des pommes de terre dénudées dans les champs ou entreposées dans des silos souterrains. Au même titre que pour les humains, les glucoalcaloïdes à haute dose sont toxiques et des empoisonnements peuvent se produire.

## C. Informations concernant la modification génétique

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

La transformation de la pomme de terre avec de l'ADN recombiné a été menée à bien avec les souches AGL0, AGL1 or LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens*. Le système de vecteur utilisé est un système binaire, dans lequel l'ADN-T, contenant les gènes qui doivent être transférés, se trouve sur un plasmide tandis que les fonctions mobilisatrices de l'ADN se trouvent sur un plasmide Ti modifié (Hoekema et al., 1983). La transformation est effectuée en prélevant du tissu au niveau de la feuille ou de la tige, puis en inoculant *A. tumefaciens*. A l'issue d'une certaine période durant laquelle explants et bactéries sont repiqués ensemble, *A. tumefaciens* est tué par administration de Claforan (Visser et al., 1991). La régénération des pousses se fait sous sélection par l'Imazamox (Andersson et al., 2003).

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

Les vecteurs binaires VCPMA16 et VCPMA19 sont tous deux basés sur le pPZP200 (Hajdukiewicz et al., 1994), qui peut être propagé tant via *E. coli* que via *A. tumefaciens*. Leur squelette comporte un fragment ColE (o-ColE1) de pBR322, qui contient l'origine de réplication chez *E. coli* ainsi qu'un site *bom* pour la mobilisation de *E. coli* à *A. tumefaciens*. Un fragment, dérivé du plasmide pVS1, contient des fonctions de réplication à large spectre d'hôtes, (o-VS1-*repA*), y compris l'origine de réplication et le gène *repA*, ainsi qu'un gène *sta* (*c-sta*) qui code des fonctions de stabilisation. De plus, le squelette comporte un gène codant la résistance à la spectinomycine (*c-aadA*), permettant ainsi la sélection bactérienne, mais qui n'est pas destiné à être transféré à la plante.

L'ADN-T de VCPMA16 et VCPMA19 est délimité par les régions flanquantes d'ADN-T droite et gauche de pTiT37 (*b-RB* et *b-LB*) originaires d'*A. tumefaciens*.

On trouvera ci-après la description des séquences de l'ADN-T.

### C.3 Taille, origine des organismes donneurs et fonction recherchée de chaque fragment constitutif de la région envisagée pour l'insertion

Les gènes portant la résistance améliorée à *P. infestans* sont des gènes de résistance provenant de *Solanum bulbocastanum*. Les plasmides VCPMA16 et VCPMA19 contiennent chacun des fragments génomiques venant de *S. bulbocastanum* et contenant le gène *Rpi-blb2* en même temps que ses régions promotrice et terminatrice endogènes. Les deux constructions géniques contiennent également des fragments génomiques venant de *S. bulbocastanum* et contenant le gène *Rpi-blb1* en même temps que ses régions promotrice et terminatrice endogènes. Le fragment de *Rpi-blb1* de *S. bulbocastanum* présent dans VCPMA19 est plus long que celui de VCPMA16, du fait que les régions promotrice et terminatrice associées sont toutes deux plus longues.

Les gènes de résistance peuvent être répartis entre différentes classes, avec la plus grande partie relevant de la classe des NBS-LRR (*site de liaison des nucléotides - région riche en leucine*) (Young, 2000). Les gènes *Rpi-blb1* (van der Vossen et al., 2003) et *Rpi-blb2* (van der Vossen et al., 2005) appartiennent tous deux à la classe de gènes de résistance NBS-LRR.

Les ADN-T des plasmides VCPMA16 et VCPMA19 contiennent un gène codant l'acétohydroxyacide synthase, permettant la sélection des tissus végétaux transformés, ainsi que des gènes portant une résistance améliorée à *Phytophthora infestans*.

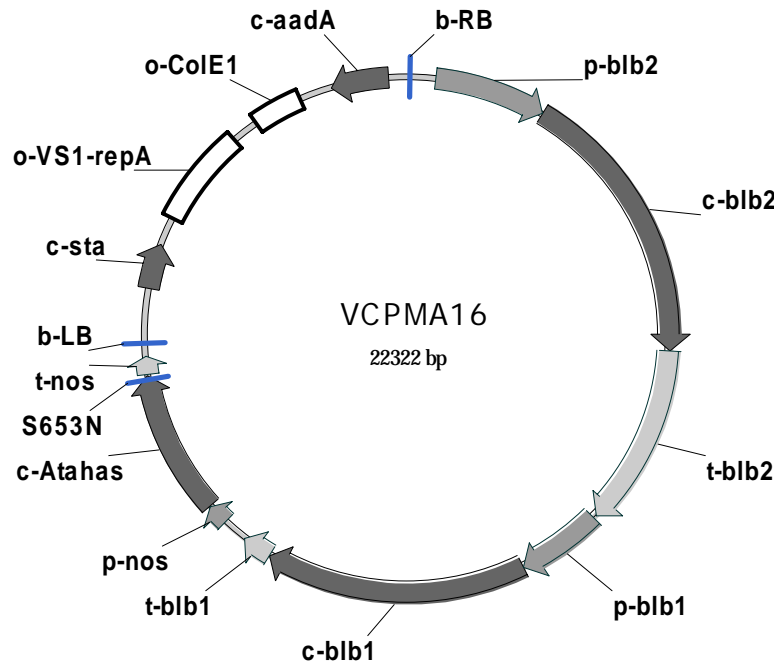
Le gène codant l'acétohydroxyacide synthase (*ahas*) est originaire d'*Arabidopsis thaliana* et présente une mutation ponctuelle correspondant à S653N dans la protéine AHAS exprimée (Chang et Duggleby, 1998). La mutation ponctuelle a pour conséquence une protéine qui confère aux tissus végétaux en culture une résistance aux herbicides de la famille des imidazolinones, et permet donc de sélectionner les tissus transformés. Les séquences promotrice et terminatrice viennent du gène codant la nopaline synthase (*nos*) et sont originaires d'*A. tumefaciens*.

Aucun des deux vecteurs ne présente de composantes connues pour coder des substances nocives.

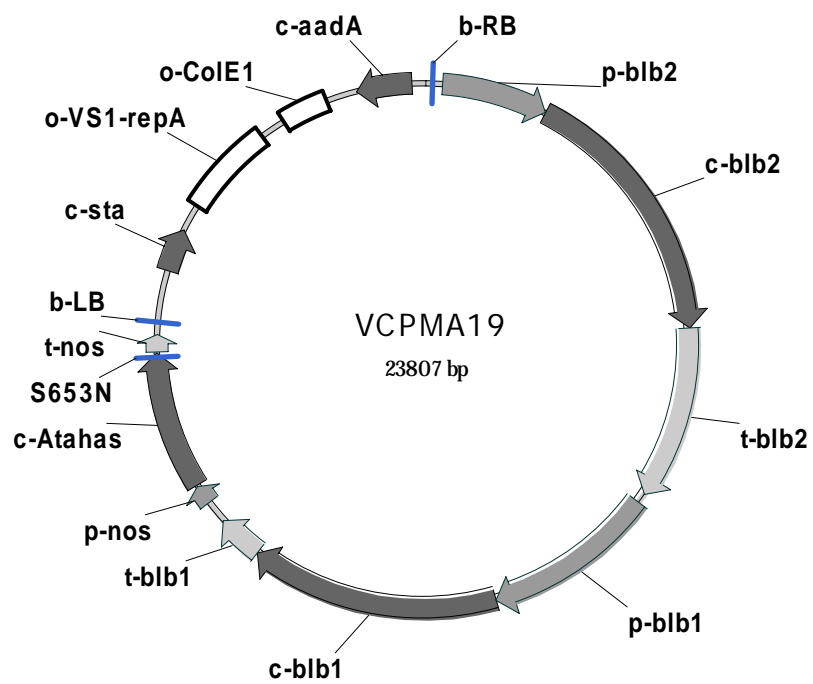
**Tableau des éléments génétiques de l'ADN-T**

<b>Abréviation</b>	<b>Nom et fonction</b>	<b>Taille [pb]</b>	<b>Origine</b>
<b>VCPMA16</b>			
ADN-T		16700	
p-blb2	Région promotrice du gène <i>Rpi-blb2</i> (y compris intron)	1530	<i>S. bulbocastanum</i>
c-blb2	Région codante du gène <i>Rpi-blb2</i> (y compris intron)	3890	<i>S. bulbocastanum</i>
t-blb2	Région terminatrice du gène <i>Rpi-blb2</i>	2530	<i>S. bulbocastanum</i>
p-blb1	Région promotrice du gène <i>Rpi-blb1</i>	1173	<i>S. bulbocastanum</i>
c-blb1	Région codante du gène <i>Rpi-blb1</i> (y compris intron)	3592	<i>S. bulbocastanum</i>
t-blb1	Région terminatrice du gène <i>Rpi-blb1</i>	406	<i>S. bulbocastanum</i>
p-nos	Promoteur du gène de la nopaline synthase	288	<i>A. tumefaciens</i>
c-Atahas	Région codante du gène de l'acétohydroxyacide synthase contenant la mutation S653N	2013	<i>A. thaliana</i>
t-nos	Région terminatrice du gène de la nopaline synthase	253	<i>A. tumefaciens</i>
<b>VCPMA19</b>			
ADN-T		18100	
p-blb2	Région promotrice du gène <i>Rpi-blb2</i> (y compris intron)	1530	<i>S. bulbocastanum</i>
c-blb2	Région codante du gène <i>Rpi-blb2</i> (y compris intron)	3890	<i>S. bulbocastanum</i>
t-blb2	Région terminatrice du gène <i>Rpi-blb2</i>	2530	<i>S. bulbocastanum</i>
p-blb1	Région promotrice du gène <i>Rpi-blb1</i>	2516	<i>S. bulbocastanum</i>
c-blb1	Région codante du gène <i>Rpi-blb1</i> (y compris intron)	3592	<i>S. bulbocastanum</i>
t-blb1	Région terminatrice du gène <i>Rpi-blb1</i>	669	<i>S. bulbocastanum</i>
p-nos	Promoteur du gène de la nopaline synthase	288	<i>A. tumefaciens</i>
c-Atahas	Région codante du gène de l'acétohydroxyacide synthase contenant la mutation S653N	2013	<i>A. thaliana</i>
t-nos	Région terminatrice du gène de la nopaline synthase	253	<i>A. tumefaciens</i>

**Diagramme du plasmide VCPMA16**



**Diagramme du plasmide VCPMA19**



## D. Informations concernant la plante supérieure génétiquement modifiée

### D.1 Description du ou des caractères ou des caractéristiques qui ont été introduits ou modifiés

Les gènes de résistance insérés, *Rpi-blb1* et *Rpi-blb2*, confèrent une résistance améliorée contre *Phytophthora infestans*.

Le gène *ahas* inséré confère une résistance aux imidazolinones mises en oeuvre pour la sélection durant le processus de transformation.

### D.2 Informations sur les séquences réellement insérées ou délétées

- (a) Taille et structure de l'insert et méthodes utilisées pour sa caractérisation, avec indication des parties de vecteur introduites dans la plante supérieure génétiquement modifiée ou de tout ADN vecteur ou étranger restant dans la plante supérieure génétiquement modifiée.

La taille des séquences d'ADN-T destinées à l'insertion est d'environ 17 kb et 18 kb respectivement pour VCPMA16 et VCPMA19. Suite à l'analyse PCR (réaction de polymérisation en chaîne) en temps réel (Ingham et al., 2001), il est confirmé que l'ensemble des gènes de l'ADN-T *Rpi-blb1*, *Rpi-blb2* et *ahas* sont présents dans chacune des lignées transgéniques qui doivent faire l'objet des essais en plein champ.

De plus, l'analyse PCR en temps réel a été effectuée pour les séquences des vecteurs extérieures à l'ADN-T, sans qu'aucune de ces séquences n'ait été détectée dans l'une quelconque des lignées de pommes de terre génétiquement modifiées qui doivent faire l'objet des essais en plein champ. Cette analyse a fait appel à deux ensembles différents d'amorces-sondes dans le squelette du vecteur, un près de la limite droite, l'autre près de la limite gauche. L'ensemble amorces-sonde près de la limite droite vise une séquence située à l'intérieur du gène *aadA* (résistance à la spectinomycine), et l'analyse démontre donc également l'absence de ce gène. On trouvera des détails sur l'analyse PCR pour le gène *ahas* et la séquence *aadA*-limite droite en *Annexe 1*.

- (b) En cas de délétion, taille et fonction des régions supprimées.

Non applicable.

- (c) Nombre de copies de l'insert

D'après une analyse PCR en temps réel (Ingham et al., 2001) avec amorces et sonde visant le gène *ahas*, chacune des lignées transgéniques destinées aux essais en plein champ contient une ou deux copies.

- (d) Localisation de l'insert dans les cellules de la plante (intégré au chromosome, aux chloroplastes ou aux mitochondries, ou sous forme non intégrée), et méthodes

Les plantes transformées résultent d'une modification génétique réalisée avec *Agrobacterium*, ce qui implique la localisation de l'insert au sein du noyau cellulaire (Zambryski, 1980; Hohn et al., 1991). La stabilité des inserts lors de la

multiplication par bouturage a été vérifiée. En conséquence, on peut considérer que les inserts sont intégrés de façon stable au génome nucléaire de la plante.

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

- (a) Informations concernant l'expression évolutive de l'insert durant le cycle de vie de la plante et les méthodes utilisées pour sa caractérisation.

L'expression des gènes *Rpi-blb1* et *Rpi-blb2* est régulée par leurs promoteurs respectifs d'origine. Il a été démontré que d'autres gènes de résistance de la classe NBS-LRR n'ont qu'un très faible niveau d'expression dans les tissus végétatifs (Michelmore et al., 2001). Les lignées génétiquement modifiées ont présenté, à l'analyse PCR en temps réel, un faible niveau d'expression des deux gènes *Rpi-blb1* et *Rpi-blb2* dans les feuilles, les tiges, les tubercules et les racines. Dans les fleurs on peut détecter un faible niveau d'expression de *Rpi-blb2*, tandis que *Rpi-blb1* s'exprime encore plus faiblement ou pas du tout.

Le gène *ahas* est contrôlé par le promoteur *nos*, dont on sait qu'il entraîne un faible niveau d'expression dans toutes les parties de la plante. L'expression du gène *ahas* dans les plants de pommes de terre génétiquement modifiés a été établie au moyen de cultures tissulaires dont la survie a été observée sur des milieux contenant de l'Imazamox.

- (b) Parties de la plante où l'insert est exprimé (par exemple, les racines, la tige, le pollen, etc...)

Voir le point (a).

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

- (a) Mode(s) et/ou vitesse de reproduction

Ni les gènes de résistance ni le gène *ahas* ne sont supposés influencer sur la formation des tubercules, la capacité à produire des graines, le développement floral ou la formation de pollen. Lorsque les lignées de pommes de terre transgéniques couvertes par la présente notification ont été cultivées sous serre, ces caractéristiques n'ont subi aucun changement. Trois lignées de pommes de terre transgéniques porteuses du gène *Rpi-blb2* ont été cultivées en plein champ en Suède en 2005 et en Suède, en Allemagne et aux Pays-Bas en 2006. Au cours des essais, il a été procédé au suivi comparatif des résultats de ces lignées GM et des lignées d'origine non GM, ainsi que de la variété Bintje en ce qui concerne plus spécialement la résistance à *Phytophthora infestans*. Croissance et développement des lignées GM ont donné lieu à des résultats normaux, comparables à ceux des lignées témoin non GM, et aucune différence significative n'est apparue jusqu'au début de la floraison. Dès le début de celle-ci les plants se trouvèrent contaminés par *Phytophthora infestans*. Tandis que les plantes témoin non GM montraient une défoliation substantielle sous l'effet de la maladie, les trois lignées de pommes de terre GM ont démontré le phénotype recherché de résistance au mildiou. De nombreux essais en plein champ ont mis en oeuvre des plantes de pommes de terre transgéniques exprimant la protéine AHAS, aux Pays-Bas, en Suède, en Allemagne et en République Tchèque, et aucune modification des propriétés susmentionnées n'a été observée.

## (b) Dissémination

Ni les gènes de résistance ni le gène *ahas* ne sont censés affecter la dispersion de graines ou de pollen. Il n'y a donc pas de raison de supposer aux clones des plantes génétiquement modifiés des différences avec les variétés d'origines à cet égard.

## (c) Capacité de survie.

La survie des tubercules de pomme de terre dépend de la température. La sensibilité au gel n'a pas de raison d'être affectée par l'introduction de gènes de résistance additionnels ou du gène *ahas*. Des pommes de terre exprimant la protéine AHAS ont été évaluées sur le terrain pour la tolérance au froid, et aucune différence par rapport aux variétés mères n'a été observée.

La pomme de terre contient déjà de nombreux autres gènes de résistance de la classe NBS-LRR (Wouters et al., 2004; voir section 19). Certains gènes NBS-LRR ont été introgressés à partir de *Solanum demissum* et confèrent une résistance à certaines souches de *P. infestans* (Ballvora et al., 2002). En conséquence, il est improbable que les lignées génétiquement modifiées de pomme de terre comportant une résistance améliorée à *Phytophthora infestans* présentent des différences, dans leur mode de reproduction, leur dissémination ou leur survivabilité, par rapport à des plantes non génétiquement modifiées.

## D.5 Stabilité génétique de l'insert et stabilité phénotypique de la plante modifiée

Les transformations réalisées au moyen d'*Agrobacterium* aboutissent en général à des insertions stables. On a observé une stabilité de la présence des inserts après analyse de matériel végétal résultant de plusieurs cycles de reproduction par bouturage et cultivé sous serre.

## D.6 Modifications de la capacité de la plante modifiée à transférer du matériel génétique dans d'autres organismes

Il n'est prévu aucun changement, par rapport aux pommes de terre conventionnelles, de la capacité de la pomme de terre génétiquement modifiée présentant une meilleure résistance à *Phytophthora infestans* à transférer du matériel génétique dans d'autres organismes. Le transfert de matériel génétique peut se produire soit par le pollen, soit par migration de matériaux en décomposition dans le sol. Le croisement avec des espèces sauvages européennes apparentées n'est pas possible pour la pomme de terre et il n'y a aucune raison de supposer que cette caractéristique pourrait être affectée par la présence des gènes de résistance ou du gène *ahas* insérés. La possibilité de croisement avec des variétés de pomme de terre conventionnelles devrait rester la même que pour les variétés mères respectives. Aucune des caractéristiques de la plante, telle qu'observées en essais en plein champ et sous serre (pour des lignées de pommes de terre génétiquement modifiées semblables à celles qui doivent être disséminées) n'a montré de différence significative avec les variétés mères. Le transfert de matériel génétique des plants de pomme de terre aux microorganismes du sol, puis leur expression réussie et leur survie à long terme, sont hautement improbables dans les conditions du terrain (Schlüter et al., 1995). La possibilité d'un transfert à des virus peut également être éliminée, dans la mesure où aucun virus connu n'a pour hôte indifféremment des plantes ou des bactéries. Par ailleurs, le transfert, puis la survie et l'expression de matériel génétique dans des bactéries ou des



cellules de l'appareil digestif humain ou animal après une consommation involontaire de parties de plante en provenance des pommes de terre destinées à être disséminées est hautement improbable dans les conditions naturelles (van den Eede, 2004).

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

Les pommes de terre génétiquement modifiées en vue d'une résistance améliorée à *Phytophthora infestans* ne devraient présenter aucun effet toxique, allergénique ou nocif sur la santé humaine ou l'environnement.

Les gènes introduits *Rpi-blb1* et *Rpi-blb2* (gènes R) sont ajoutés au génome de la pomme de terre, qui comporte déjà des gènes de résistance de la classe NBS-LRR (*site de liaison des nucléotides - région riche en leucine*). La famille de gènes NBS-LRR comprend la plus grande partie des gènes de résistance aux maladies des végétaux (gènes R) connus à ce jour, et les protéines exprimées par les gènes de résistance ont toutes la même structure protéique. De plus le génome de la pomme de terre contient des gènes de résistance dérivés de la pomme de terre sauvage *Solanum demissum* (Wastie, 1991). Aucun élément de la classe de protéines NBS-LRR n'a été associé à ce jour à des caractéristiques toxiques ou allergènes. Les homologues des gènes de résistance sont très abondants dans toutes les espèces végétales (Dangl et Jones, 2001) et leur nombre a pu être déterminé pour les espèces pour lesquelles les informations de séquence génique ADN sont disponibles : environ 500 pour le riz et 200 pour *Arabidopsis thaliana*. L'expression des gènes de résistance (*Rpi-blb1* et *Rpi-blb2*) introduits dans les pommes de terre génétiquement modifiées, sous le contrôle de leurs promoteurs endogènes respectifs, reste à des niveaux très faibles, comparables à ceux des autres gènes de résistance.

Le gène marqueur introduit aux fins de sélection est exprimé par l'enzyme AHAS. L'AHAS (EC 4.1.3.18, également appelée acétolactate synthase ALS) se trouve dans les bactéries, d'autres microorganismes, et les végétaux. Elle catalyse la première étape de la biosynthèse des acides aminés ramifiés essentiels que sont l'isoleucine et la valine. La substitution d'un unique acide aminé dans l'enzyme AHAS altère le site de fixation des herbicides à base d'imidazolinone et confère ainsi un phénotype résistant à ceux-ci. De nombreuses études ont démontré que, en dehors de leur tolérance vis-à-vis des herbicides à base d'imidazolinone, les enzymes AHAS tolérantes à l'imidazolinone ont des propriétés catalytiques identiques aux enzymes AHAS naturelles, sensibles à l'imidazolinone, y compris la rétro-inhibition par l'isoleucine et la valine. On sait que des mutations provoquées ou acquises permettent de conférer une tolérance à des groupes donnés d'herbicides chez les plantes cultivées (Chang et al., 1998). L'innocuité alimentaire, tant envers les humains que les animaux, et environnementale des plantes tolérantes à l'imidazolinone a été contrôlée par Health Canada et par l'Agence canadienne d'inspection des aliments pour le maïs, le riz, le colza, le tournesol, les lentilles et le blé. Le maïs tolérant à l'imidazolinone, ou CLEARFIELD, est cultivé aux États-unis depuis 1992, le colza CLEARFIELD depuis 1996 et le blé CLEARFIELD depuis 2001.

D.8 Informations concernant la sécurité de la plante modifiée pour la santé des animaux, lorsque la plante est destinée à être utilisée dans l'alimentation animale

Les pommes de terre génétiquement modifiées destinées à l'essai en plein champ ne seront pas utilisées pour l'alimentation animale.

D.9 Mécanisme d'interaction entre la plante modifiée et les organismes cibles

L'organisme visé par la résistance introduite est *Phytophthora infestans*. On prévoit une réduction de la capacité de *P. infestans* à contaminer les pommes de terre génétiquement modifiées, en raison de la présence des gènes de résistance introduits. Les gènes de résistance codent des récepteurs capables d'identifier des facteurs d'avirulence spécifiques inoculés par l'organisme pathogène. Cette identification conduit, via un réseau d'échanges de signaux, au déclenchement de réactions de défense tant locales que systémiques. La réaction locale vise à piéger l'organisme pathogène dans les cellules où il a pénétré en premier, par la mort localisée de ces cellules, ce qui bloque la pénétration et l'infection. La réaction systémique induit l'expression de gènes liés aux mécanismes de défense dans les autres parties de la plante (Heil et Bostock, 2002).

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

Les gènes de résistance de la classe NBS-LRR sont très spécifiques, limités à une espèce ou à une race, et sont à l'origine d'une réaction de résistance (Hammond-Kosack et Parker, 2003). L'identification de l'organisme pathogène cible nécessite l'inoculation par celui-ci d'un facteur d'avirulence hautement spécifique. Les facteurs spécifiques d'avirulence pour les gènes *Rpi-blb1* et *Rpi-blb2* sont, dans l'état actuel des connaissances, produits uniquement par *P. infestans*. En raison de cette spécificité de la réaction, aucun effet ne devrait intéresser les organismes autres que *P. infestans*, à l'exception d'effets relevant de l'interaction entre pommes de terre non génétiquement modifiées et organismes non-cibles dans le cadre des façons culturales conventionnelles. La réduction des besoins en traitements antifongiques peut entraîner un accroissement des populations d'organismes non-cibles qui sont affectés par ces traitements. Ce sont les seules conséquences prévisibles en termes d'interactions. Les essais prévus permettront en outre d'examiner tous changements éventuels dans les interactions avec les organismes non-cibles, au moyen d'observations ciblant la susceptibilité aux maladies et aux pathogènes.

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

Il est improbable que les pommes de terre génétiquement modifiées présentant une meilleure résistance à *Phytophthora infestans* présentent une différence quelconque avec les pommes de terre non modifiées en ce qui concerne leurs interactions avec l'environnement abiotique. Aucun des gènes introduits n'a un rapport avec la tolérance au gel, à la sécheresse ou à la salinité. La réaction d'hypersensibilité des plantes de pomme de terre transgéniques à l'attaque du champignon ne saurait influencer sur leurs interactions avec l'environnement abiotique. Les essais en plein champ seront l'objet de façons culturales conventionnelles, exception faite d'une réduction du traitement antifongique en vue de l'observation du caractère introduit. De plus la dissémination proposée permettra d'explorer toute interaction possible avec l'environnement abiotique grâce à la collecte et à l'analyse comparative des données de rendement en tubercules. *Phytophthora infestans* est déjà présent dans le sol et a besoin de conditions climatiques favorables (p. ex. humidité) pour attaquer les plantes de pomme de terre. Les façons culturales classiques (p. ex. rotation des cultures, applications d'herbicides et d'insecticides, applications de fongicide réduites) seront mises en oeuvre. La réaction d'hypersensibilité des plants de pomme de terre transgéniques à l'attaque du champignon ne devrait pas non plus influencer sur les interactions de celui-ci avec l'environnement abiotique.

#### D.12 Description des méthodes de détection et d'identification de la plante supérieure génétiquement modifiée

Des protocoles basés sur l'analyse PCR en temps réel ont été mis au point pour les gènes *Rpi-blb1*, *Rpi-blb2* et *ahas* et tous peuvent être mis à contribution pour distinguer les lignées de pommes de terre transgéniques des lignées mères.

#### D.13 Informations, le cas échéant, sur les précédentes disséminations de la plante génétiquement modifiée

Des lignées de pommes de terre transgéniques porteuses du gène *Rpi-blb2* ont été disséminées en plein champ en Suède en 2005 (autorisation n° B/SE05/03), et en 2006 des lignées de pommes de terre transgéniques porteuses des gènes *Rpi-blb2* et *Rpi-blb1* ont été disséminées en plein champ en Suède (autorisation n° B/SE/05/8615), aux Pays-Bas (autorisation n° B/NL/05/03) ainsi qu'en Allemagne (autorisation n° B/DE/05/174).

Des essais en plein champ ont eu lieu en divers emplacements, en Suède depuis 2002, en Allemagne depuis 2004, aux Pays-Bas depuis 2004, et en République tchèque depuis 2005, pour des pommes de terre génétiquement modifiées en vue de modifier leur composition en féculé, et porteuses du gène *ahas* comme gène marqueur de sélection.

Au cours de ces essais il n'est apparu aucun effet inattendu par rapport aux variétés conventionnelles de pommes de terre.

## E. Informations concernant le site de dissémination

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

La localisation des sites de dissémination se présente comme suit:

- Commune 02390 Mont d'Origny
- Commune 02410 Septvaux
- Commune 62161 Duisans
- Commune 62217 Tilloy lès Mofflaines

Les sites de Septvaux et de Duisans sont destinés à être utilisés dès 2007. Le site de Mont d'Origny et Tilloy lès Mofflaines sera incorporé au réseau d'expérimentation en 2008.

Chaque année les plantes transgéniques occuperont au plus un hectare dans une parcelle expérimentale de moins de 2 ha. Les dimensions approximatives de la parcelle de culture sont indiquées dans le programme d'essais contenu dans l'*Annexe 2*. La parcelle fera l'objet d'une rotation annuelle dans les limites du site retenu de façon à observer l'apparition de repousses et à respecter les exigences de rotation des cultures en matière de culture de la pomme de terre.

Année	Nombre de sites	Surface plantée maximale
2007	2	1 ha
2008	4	1 ha
2009	4	1 ha
2010	4	1 ha
2011	4	1 ha

### E.2 Description de l'écosystème des sites de dissémination

Les sites de sont dans des zones agricoles présentant la flore et la faune typiques des limons fins du Nord de la France.

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

Les champs autour des sites de dissémination seront affectés à des cultures commerciales en suivant des façons culturales conventionnelles, rotation des cultures y comprise. Aucune pomme de terre ne sera cultivée à proximité immédiate du site expérimental. Aucune espèce sauvage apparentée, sexuellement compatible, n'est présente sur le site.

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

Les sites choisis pour ces essais se situent dans une zone agricole qui n'est pas à proximité de biotopes officiellement reconnus ou de zones protégées.

## F. Information concernant la dissémination

### F.1 Objectif de la dissémination

Les essais ont pour objet la recherche appliquée. Au cours des trois ou quatre années initiales, des cultures expérimentales à petite échelle serviront à sélectionner les événements selon le critère de résistance améliorée à *Phytophthora infestans* (confirmation du concept dans les conditions de terrain spécifiques à la France et avec des races de *Phytophthora infestans* spécifiques à la France). De plus, pendant les essais, il sera procédé à l'observation et à l'enregistrement de la performance agronomique (p. ex. vigueur et rendement de la plante), et de diverses caractéristiques de la plante (p.ex. levée, floraison, maturation), ainsi que de la stabilité du caractère introduit. De plus, au cours de la dernière ou des deux dernières années des essais, il sera procédé, dans le contexte de la recherche portant sur l'évaluation du risque, à la collecte de données relatives à diverses lignées de pommes de terre résistantes à *Phytophthora* et à leur comparaison avec des lignées réceptrices non modifiées, ou avec des variétés conventionnelles de pomme de terre. Il s'agit des questions de gestion des repousses, de stabilité de l'expression (p. ex. prélèvement de tissus à divers stades de développement pour examiner l'expression des gènes introduits), de possibilité d'effets sur les insectes associés à la pomme de terre, et de possibilité de changements de ses propriétés qualitatives (p. ex. la qualité du tubercule). Le matériel végétal recueilli servira à diverses analyses (y compris des tests faisant appel à la biologie moléculaire et à la biochimie). Les tubercules pourront, le cas échéant, être utilisés pour fournir du matériel semencier pour la saison suivante.

L'objectif à long terme est la mise au point de variétés de pomme de terre présentant une résistance améliorée à *P. infestans*.

### F.2 Date et durée prévues de l'opération

Il est prévu de procéder à la dissémination des lignées de pommes de terre génétiquement modifiées entre avril et octobre des années 2007 à 2011, avec la plantation entre avril et juin, et la récolte en septembre-octobre de chaque année.

### F.3 Méthode de dissémination envisagée

Les lignées de pommes de terre génétiquement modifiées seront plantées, sous forme de tubercules ou de minitubercules, par des moyens manuels ou mécaniques, en suivant les pratiques conventionnelles des essais en plein champ. Les tubercules seront disposés par rangées et par parcelles en fonction des protocoles expérimentaux appropriés.

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

La préparation et la gestion du site de dissémination se feront selon les façons culturales conventionnelles. Cela inclut, mais sans y être limité, l'utilisation d'engrais, de fongicides ou d'insecticides. Les adventices seront enlevées par des moyens manuels ou chimiques. De plus, il sera procédé à des inoculations de races de *Phytophthora infestans* spécifiques à la France. L'inoculation de

pathotypes d'origine française de *Phytophthora infestans* est une pratique courante et sera effectuée en suivant les procédés conventionnels d'essais en plein champ, par des moyens manuels ou mécaniques. Les plants de pomme de terre seront plantés directement en terre. Les lignées seront disposées de façon aléatoire. Un exemple de la disposition utilisée pour les essais est donné en *Annexe 2*. Des bandes de contamination contenant des pommes de terre de variétés conventionnelles seront disposées entre les parcelles et autour d'elles. La récolte sera précédée par une défoliation (au moyen d'un défoliant homologué), et après enlèvement des parties aériennes de la plante, les tubercules seront récoltés par des moyens manuels ou mécaniques.

#### F.5 Nombre approximatif de plantes

La densité de plantation respectera les façons culturales conventionnelles, avec un nombre maximum de 45.000 tubercules par hectare et par an. En conséquence, la première année, le nombre de plantes par lignée transgénique ne dépassera pas 500 par site (voir annexe 1 pour la liste des lignées disponibles).

## **G. Information sur les plans de surveillance, de contrôle et de traitement du site et des déchets après dissémination**

### G.1 Précautions prises

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

Il n'existe pas en France d'espèces sauvages apparentées sexuellement compatibles avec la pomme de terre. Les seules espèces sexuellement compatibles seront les pommes de terre cultivées commercialement. Une distance d'isolation de 10 m sera respectée entre les lignées transgéniques et les variétés de pommes de terre commerciales tout au long des essais. Une surveillance constante sera exercée pour détecter les repousses, qui seront détruits dès leur levée. Après la récolte, les cultures mises en oeuvre sur les sites de dissémination seront limitées aux espèces permettant la détection des repousses. Durant l'année suivant immédiatement la dissémination, la parcelle d'essai restera en jachère ou sera semée avec une culture permettant la lutte contre les adventices.

- (b) Mesures visant à minimiser ou à empêcher la dissémination de tout organe reproducteur de la plante supérieure génétiquement modifiée (par exemple pollen, graines, tubercules).

Pendant le transport et la manutention, les pommes de terre seront clairement étiquetées, séparées des pommes de terre conventionnelles, et emballées dans des contenants fermés et à double paroi. Tout équipement ou machine utilisé pour la plantation et la récolte sera nettoyé sur place. Tout matériel végétal en excédent (tubercules après plantation, ou après récolte) sera inactivé (p.ex. par chauffage ou broyage). Une distance d'isolation d'au moins 10 m sera respectée avec les pommes de terre sous culture commerciale.

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

Le site de dissémination sera géré selon les façons culturales conventionnelles. La première année suivant la dissémination, le programme de surveillance des repousses démarre, et la parcelle soit reste en jachère, soit est mise en culture avec une espèce facilitant la lutte contre les adventices pour l'année en question. Tant que le programme de surveillance des repousses sera en place, la parcelle d'essai ne sera pas plantée en pommes de terre, cependant d'autres plantes peuvent être cultivées sous réserve qu'elles permettent cette surveillance. Les repousses seront détruits par herbicide (de type systémique, p. ex. glyphosate) avant la floraison. Au cas où des repousses devraient apparaître dès la première année de surveillance, celle-ci serait prolongée d'un an. Au cours des années suivant la fin du programme de surveillance des repousses, le site de dissémination sera cultivé en se conformant aux pratiques locales de rotation des cultures pour la culture de pommes de terre.

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

La récolte sera effectuée en conformité avec les pratiques agricoles conventionnelles, par des moyens manuels ou mécaniques. Après récolte, les tubercules seront enlevés du site de dissémination et dirigés soit pour un entreposage temporaire en Allemagne (p. ex. pour estimation de leur qualité) et leur élimination (inactivation, p.ex. par chauffage, ou par enfouissement dans une décharge), soit pour analyse vers BASF Plant Science GmbH, Limburgerhof, Allemagne; bioaktiv GmbH, Groß Lüsewitz, Allemagne, et Plant Science Sweden, Svalöv, Suède. Tout tubercule laissé sur le site de dissémination après la récolte sera collecté et transporté hors site pour inactivation. Les parties aériennes vertes des plantes seront inactivées avant la récolte, par des moyens chimiques ou mécaniques, et laissées sur place pour se décomposer. Les tubercules transgéniques produits au cours des essais ne seront pas utilisés pour l'alimentation humaine ou animale.



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

Le programme de surveillance ci-dessous est basé sur les conclusions de l'analyse de risque environnemental; son objectif est d'assurer une détection et une identification précoces des effets, attendus et inattendus, liés à la dissémination des plants de pomme de terre génétiquement modifiés.

Hypothèses de base de l'analyse de risque	Observations effectuées par le notifiant
Surveillance liée à un problème spécifique	
Absence d'avantage sélectif suite à la résistance améliorée à <i>P. infestans</i>	Détection des repousses
Absence d'avantage/désavantage sélectif conféré à des espèces végétales sexuellement compatibles	Détection des repousses
Effets recherchés sur l'organisme visé <i>P. infestans</i>	Observations sur les variations de tolérance à <i>P. infestans</i>
Absence d'impact sur l'environnement suite à des interactions avec des organismes non-cibles	Observations sur les variations de susceptibilité aux parasites et maladies associés à la pomme de terre, sous façons culturales conventionnelles
Surveillance à caractère général	
Absence de différences portant sur les caractères généraux de la plante: taille, port, floraison, développement	Observations sur les caractères généraux de la plante et sa performance agronomique
Absence de différences portant sur la susceptibilité aux maladies et aux parasites	Observations sur les variations de susceptibilité aux parasites et maladies associés à la pomme de terre, sous façons culturales conventionnelles
Absence de différence en ce qui concerne la compétitivité	Détection des repousses
Restriction de la présence de la pomme de terre au site de dissémination	Vérification de la mise en oeuvre des mesures de gestion du risque (registre d'observations, accès restreint)

#### Lignées témoins

La performance des lignées de pommes de terre génétiquement modifiées sera comparée à celle des variétés réceptrices non transformées, cultivées en parallèle sur le même site.

## **Chronologie**

Tout au long de la phase de végétation des pommes de terre (à peu près d'avril à octobre), la zone de dissémination sera visitée, à intervalles prédéterminés (au moins une fois par mois), par le personnel compétent en charge de l'application de la réglementation, pour observer la dissémination. Après la dissémination, le personnel compétent en charge de l'application de la réglementation continuera de surveiller la zone de dissémination à intervalles prédéterminés pendant toute la durée du programme de surveillance des repousses.

## **Responsabilités**

La responsabilité du programme de surveillance incombe au notifiant. Les surveillances liées à des problèmes spécifiques et celles à caractère général seront mises en oeuvre par BASF Plant Science et des personnes sous contrat, y compris le personnel compétent en charge de l'application de la réglementation.

## **Zone concernée**

Il s'agit du site de dissémination et des parcelles d'essais individuelles soumis à une surveillance.

## **Inspections**

La zone de dissémination sera visitée par le personnel compétent en charge de l'application de la réglementation. Les autorités compétentes peuvent également procéder à des inspections.

## **Collecte et évaluation des données**

BASF Plant Science sera responsable de l'enregistrement des observations et des analyses réalisées dans le cadre du programme de surveillance. Les données seront collectées et analysées par BASF Plant Science dans le respect des spécifications. Des registres d'observations de terrain seront tenus durant la période de dissémination.

## **Rapports**

Toute information concernant des événements inattendus pouvant être associés avec des effets nocifs éventuels sur l'environnement et la santé humaine, et directement liés aux lignées transgéniques de pomme de terre, sera communiquée aux autorités compétentes, et les mesures appropriées mises en oeuvre en conséquence. Un rapport annuel leur sera soumis comportant un résumé des observations recueillies durant les essais en plein champ.

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

Au cas où le site expérimental serait la cible de vandalisme, des mesures seront prises pour éviter une dissémination accidentelle des pommes de terre transgéniques, p. ex. l'enlèvement et la destruction de tout plant arraché, ou la terminaison prématurée des essais selon les procédures de récolte décrites ci-dessus. Ou encore, en fonction du stade de développement atteint par les plantes de pomme de terre, le site pourrait être traité avec un herbicide approprié et le matériel végétal enfoui à la charrue.

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

Le site de dissémination sera clôturé, si nécessaire, pour le protéger contre les déprédations des animaux.

## H. Conclusions concernant les incidences potentielles sur l'environnement de la dissémination

- H.1. Probabilité que les plantes modifiées deviennent plus persistantes que les plantes parentales ou réceptrices dans les habitats agricoles ou se propagent plus rapidement dans les habitats naturels

Ni les gènes de résistance ni le gène *ahas* ne sont de nature à conférer aux pommes de terre transgéniques des caractères à l'origine de capacités améliorées de compétition dans des écosystèmes non contrôlés, ou de concurrence spatiale à l'encontre de plantes similaires. Les caractéristiques transférées à la pomme de terre transgénique - tolérance au champignon *Phytophthora infestans* et tolérance aux herbicides du groupe des imidazolinones en culture tissulaire - ne sont pas de nature à influencer sur la production et la fertilité du pollen, la dispersion des graines ou la résistance au gel. Les graines et tubercules qui pourraient être disséminés hors des zones cultivées n'auraient aucune capacité compétitive dans cet environnement. Les pommes de terre ne sont pas pérennes en dehors de l'environnement agricole, et il n'existe pas de pommes de terre à l'état sauvage dans le climat français. Il n'est donc pas probable que les gènes de résistance et *ahas* introduits puissent conférer une quelconque différence par rapport aux variétés conventionnelles en ce qui concerne la persistance des plantes dans les habitats à utilisation agricole, ou l'invasivité dans les habitats naturels. De plus des mesures de prévention du risque seront mises en oeuvre: façons culturales conventionnelles, y compris rotation des cultures, mise en oeuvre de distances d'isolation et contrôle des repousses, ce qui assurera une maîtrise efficace des repousses qui pourraient lever sur le site et à ses alentours immédiats. L'impact d'ensemble est donc estimé négligeable.

- H.2. Avantages ou inconvénients sélectifs conférés à la plante modifiée

L'effet recherché de la modification génétique est une amélioration de la résistance à *P. infestans*. En conséquence, confrontée à une pression par *P. infestans* dans l'environnement agricole, les pommes de terre résistantes devraient bénéficier d'un avantage sélectif par rapport aux pommes de terre conventionnelles non résistantes. Cet avantage n'est effectif que dans l'environnement agricole et uniquement dans les cas où aucune autre mesure de protection contre *P. infestans* n'est mise en oeuvre. La conjugaison de façons culturales conventionnelles et du contrôle des repousses permettra d'assurer un contrôle efficace des repousses susceptibles d'apparaître sur le site et ses alentours. On ne trouve jamais de pommes de terre en dehors de l'environnement agricole, et la résistance à *P. infestans* n'est pas un facteur clé du potentiel d'invasion des pommes de terre.

Le gène marqueur introduit pour la sélection confère une résistance améliorée aux herbicides du groupe des imidazolinones en culture tissulaire. Cependant, en culture sous serre les plants transgéniques de pomme de terre porteurs du gène *ahas* ne présentent pas de tolérance aux imidazolinones et il n'y a donc pas lieu non plus de s'attendre à une tolérance aux produits commerciaux pulvérisés en plein champ. Cela ne conférerait au demeurant pas d'avantage sélectif, dans la mesure où l'utilisation sur les pommes de terre des herbicides à base d'imidazolinone n'est pas approuvée en France.

- H.3. Possibilité de transfert de gènes aux mêmes espèces ou à d'autres espèces végétales sexuellement compatibles dans les conditions de plantation des plantes modifiées et avantages ou inconvénients sélectifs conférés à ces espèces végétales

Le transfert de matériel génétique vers des plantes sexuellement compatibles par pollinisation est possible à partir de pommes de terre conventionnelles ainsi qu'à partir de pommes de terre transgéniques. Un tel transfert vers d'autres espèces ou des espèces apparentées sauvages à proximité du site de dissémination est hautement improbable en raison de l'absence d'espèces sexuellement compatibles. On peut donc exclure les croisements avec de telles espèces. Le transfert de matériel génétique par pollinisation vers des variétés conventionnelles est possible, cependant les mesures de maîtrise du risque envisagées (p. ex. distances d'isolation, contrôle des repousses) permettront d'empêcher toute pollinisation non souhaitée. Au cas peu probable où du pollen serait transmis vers des pommes de terre non génétiquement modifiées, les conséquences seraient négligeables. Il n'en résulterait ni avantage ni inconvénient en termes de sélection pour ces pommes de terre. Le risque d'introduction des caractères de l'OGM dans des pommes de terre conventionnelles est nul dans la mesure où la pomme de terre se propage par voie végétative en Europe.

- H.4. Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les plantes modifiées et les organismes cibles, tels que prédateurs, parasitoïdes et agents pathogènes peuvent avoir sur l'environnement

L'organisme visé par l'introduction des gènes de résistance est *Phytophthora infestans*. L'effet recherché de la modification génétique est de conférer une tolérance à *P. infestans*, réduisant par là même sa population dans le champ de pommes de terre. Cet effet est acceptable et souhaitable, puisque le contrôle de *P. infestans* est également effectué dans le cadre de façons culturales conventionnelles au moyen de traitements fongicides. L'impact global sur les organismes visés de l'utilisation de pommes de terre transgéniques est donc considéré comme similaire à celui des applications de fongicides mises en oeuvre dans le cadre de façons culturales conventionnelles.

- H.5. Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les plantes modifiées et des organismes non-cibles peuvent avoir, notamment les incidences sur les niveaux de population des concurrents, herbivores, symbiotes, parasites et agents pathogènes

Les gènes de résistance introduits dans les pommes de terre transgéniques appartiennent à la classe NBS-LRR et sont donc hautement spécifiques soit à une espèce, soit à une race dans leur activité de détection des organismes qu'ils visent. Le mode d'action des gènes de résistance fait appel à une réaction d'hypersensibilité conduisant à une nécrose des cellules végétales. En raison de la spécificité de cette réaction, on ne doit pas s'attendre à des effets sur d'autres organismes que *P. infestans* si ce n'est ceux qui peuvent affecter les interactions avec des pommes de terre non génétiquement modifiées dans le cadre de façons culturales conventionnelles. On peut s'attendre, en raison d'un moindre recours aux traitements antifongiques, à un accroissement des populations d'organismes non-cibles affectés par ces traitements. Le programme de surveillance mis en oeuvre durant la dissémination comportera des observations sur la susceptibilité aux maladies et aux parasites, fournissant

un indicateur sur les effets sur les organismes non-cibles. L'impact d'ensemble sur les organismes non-cibles est considéré comme négligeable.

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

Les pommes de terre transgéniques diffèrent des variétés conventionnelles par leur tolérance à *Phytophthora infestans* conférée par les gènes de résistance introduits. La pomme de terre comporte déjà un grand nombre de gènes de résistance qui lui apportent une tolérance à d'autres maladies, ces gènes appartenant pour leur plus grande partie à la classe NBS-LRR class. Elle comporte également des gènes transférés à partir d'espèces sauvages de pomme de terre par introgression. Aucun de ces gènes n'a été associé à des effets allergéniques ou toxiques sur la santé humaine. Leur mode d'action fait appel à une réaction d'hypersensibilité lors de l'infection par le champignon, entraînant la nécrose des cellules végétales. Les gènes introduits sont exprimés par leurs promoteurs endogènes à des niveaux extrêmement faibles, comparables au niveau d'expression des autres gènes de résistance d'origine endogène.

Le gène marqueur introduit à des fins de sélection est exprimé par l'enzyme AHAS, une enzyme présente dans toutes les espèces végétales et ne présentant, en l'état actuel des connaissances, aucun caractère allergène ou toxique. L'innocuité alimentaire, tant envers les humains que les animaux, et environnementale des plantes avec une tolérance à l'imidazolinone induite par l'AHAS a été contrôlée par Health Canada et par l'Agence canadienne d'inspection des aliments pour le maïs, le riz, le colza, le tournesol, les lentilles et le blé tolérants à l'imidazolinone. Le maïs tolérant à l'imidazolinone, ou CLEARFIELD, est cultivé aux États-unis depuis 1992, le colza CLEARFIELD depuis 1996 et le blé CLEARFIELD depuis 2001.

Les plantes de pomme de terre ne sont pas destinés à l'alimentation humaine et les mesures prises en ce qui concerne leur plantation, leur récolte, leur entreposage et leur transport réduiront au minimum leur contact avec des humains. En conséquence l'effet d'ensemble sur la santé humaine est négligeable.

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

Les pommes de terre transgéniques ne sont pas destinées à l'alimentation animale. Les mesures prises dans le cadre des pratiques actuelles de dissémination assureront une protection contre les déprédations des animaux sauvages (p. ex. clôtures) ainsi que la minimisation du contact avec des animaux au cours de la récolte, de l'entreposage, du transport et de l'élimination (p.ex. nettoyage de l'équipement ou emballage) des pommes de terre de semence et du matériel végétal. En conséquence l'effet d'ensemble sur la santé humaine est négligeable.

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

Les gènes de résistance introduits dans les pommes de terre transgéniques leur confèrent une résistance contre *Phytophthora infestans*, qui est l'organisme visé. Les gènes de résistance codent des sites récepteurs qui reconnaissent les élicitines spécifiques injectées par le pathogène dans la cellule végétale. Cette identification conduit, via un réseau d'échanges de signaux, au déclenchement de réactions de défense tant locales que systémiques. La réaction locale vise à piéger l'organisme pathogène dans les cellules, par la mort localisée de ces cellules, ce qui bloque la pénétration et la propagation. La nature même de ce système de défense rend impossible l'exsudation dans le sol, par la plante, des protéines ainsi exprimées. On ne prévoit donc pas d'impact sur les processus biogéochimiques, en dehors de ceux qui peuvent survenir dans le cadre de façons culturales conventionnelles appliquées à des variétés non transgéniques de pomme de terre. On peut s'attendre, en raison d'un moindre recours aux traitements antifongiques, à un accroissement de la microflore du sol. L'effet d'ensemble sur les processus biogéochimiques est négligeable.

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

Il s'agit d'un essai à petite échelle qui sera conduit en suivant les façons culturales conventionnelles, exception faite d'une réduction des traitements antifongiques en vue d'évaluer l'efficacité contre *Phytophthora infestans* des gènes de résistance introduits. L'application de traitements antifongiques selon des dosages variables est une pratique standard aussi bien dans les façons culturales conventionnelles ou bio que dans la conduite classique d'expérimentation en protection des végétaux. Les variations apportées au mode d'utilisation des fongicides sont de nature à influencer sur le biotope du sol, par exemple en augmentant la microflore. En conséquence l'impact d'ensemble sur l'environnement est négligeable et comparable à l'effet de la culture de pommes de terre non transgéniques, avec une possibilité d'effet positif sur la microflore du sol.

<b>Étape 1</b> <b>Effet nocif susceptible d'être causé par un caractère donné de la plante transgénique (= "risque")</b>	<b>Étape 2</b> <b>Evaluation des conséquences potentielles si l'effet nocif se produit</b>	<b>Étape 3</b> <b>Evaluation de la probabilité d'apparition de chaque effet nocif potentiel identifié</b>	<b>Étape 4</b> <b>Estimation du risque représenté par chaque trait identifié de l'organisme transgénique</b>	<b>Étape 5</b> <b>Application de stratégies de contrôle du risque associé à la dissémination planifiée</b>	<b>Étape 6</b> <b>Détermination du risque d'ensemble entraîné par l'OGM</b>
Invasivité (dans les habitats naturels) ou persistance (dans les habitats agricoles) accrues.	Négligeables. Les caractères introduits ne confèrent pas de capacités de compétition dans les habitats naturels ou agricoles. Mise en oeuvre de façons culturales conventionnelles et du contrôle des repousses.	Hautement improbable. Ni les gènes de résistance ni le gène <i>ahas</i> ne confèrent à l'OGM de caractères apportant des capacités de compétition dans des écosystèmes non contrôlés, ou dans le cadre d'une concurrence spatiale avec d'autres plantes similaires. Aucun des caractères transmis aux plants de pommes de terre ne devraient modifier leur production ou leur fertilité pollinique, la dispersion de leurs graines ou leur tolérance au gel.	Négligeable. On observe rarement des plants de pomme de terre viables et susceptibles de se reproduire hors culture.	Mise en oeuvre de façons culturales conventionnelles et du contrôle des repousses (surveillance et destruction des repousses, distances d'isolation, rotation des cultures)	Effet d'ensemble négligeable.



Avantage sélectif du fait de l'amélioration de la résistance à <i>P. infestans</i> .	Modérées. L'effet recherché par la modification génétique est l'amélioration de la résistance à <i>P. infestans</i> , en conséquence un avantage sélectif est conféré par rapport aux variétés conventionnelles non résistantes et non traitées.	Probable. L'effet recherché par la modification génétique est l'amélioration de la résistance à <i>P. infestans</i> . L'avantage sélectif par rapport aux variétés conventionnelles non résistantes et non traitées dans l'environnement agricole, sous pression par <i>P. infestans</i> , est donc l'effet voulu.	Cet avantage ne joue que dans l'environnement agricole et en l'absence d'autres mesures de lutte anti- <i>P. infestans</i> . Les plantes de pomme de terre sont rarement observés hors champs. La résistance à <i>P. infestans</i> n'est pas le critère déterminant pour le potentiel d'invasivité d'une pomme de terre.	Mise en oeuvre de façons culturales conventionnelles et du contrôle des repousses (surveillance et destruction des repousses)	Effet d'ensemble négligeable.
Avantage sélectif du fait de la tolérance aux imidazolinones.	Négligeables. Avantage sélectif nul puisque pas d'approbation des herbicides à l'imidazolinone en France pour les cultures.	Peu probable. Le gène <i>ahas</i> confère bien aux cellules végétales une tolérance aux imidazolinones, mais uniquement en culture tissulaire. Les pommes de terre transgéniques avec le gène <i>ahas</i> ne montrent aucune tolérance aux dosages commerciaux d'imidazolinones en culture sous serre.	Avantage sélectif nul puisque pas d'approbation des herbicides à l'imidazolinone en France pour les cultures et pas de tolérance aux dosages commerciaux d'imidazolinones	Aucune mesure de maîtrise du risque n'est nécessaire.	Effet d'ensemble négligeable.

Transmission d'avantage ou de désavantage sélectif à des espèces végétales sexuellement compatibles.	Négligeables. La pomme de terre est propagée par voie végétative et aucun des caractères concernés ne confère un avantage sélectif dans l'environnement agricole sous façons culturales conventionnelles.	Hautement improbable. Aucun des deux caractères concernés ne confère un avantage sélectif dans l'environnement agricole sous façons culturales conventionnelles. Il n'existe pas d'espèces sauvages sexuellement compatibles en France. La pollinisation de pommes de terre cultivées est possible mais peu probable en raison du faible rayon de pollinisation.	Dans le cas peu probable où une pollinisation de variétés non transgéniques aurait lieu, les conséquences seraient négligeables puisque en Europe la pomme de terre est propagée par voie végétative.	Façons culturales conventionnelles et contrôle des repousses. Distance d'isolation par rapport aux autres cultures de pommes de terres.	Effet d'ensemble négligeable.
Effets potentiels sur l'environnement découlant des interactions entre la plante transgénique et l'organisme visé ( <i>P. infestans</i> ).	Faibles. L'effet recherché par la transmission des gènes de résistance est l'amélioration de la résistance à <i>P. infestans</i> , entraînant une diminution de la population de <i>P. infestans</i> .	Hautement probable. L'effet recherché par la modification génétique est la tolérance à l'organisme visé, <i>P. infestans</i> .	L'effet recherché est une réduction de la population de <i>P. infestans</i> dans le champ de pommes de terre, effet qui est souhaitable et recherché également dans le cas de façons culturales conventionnelles telles que le traitement antifongique des cultures de pommes de terre.	Aucune.	Effet d'ensemble négligeable.

Effets potentiels sur l'environnement découlant des interactions entre la plante transgénique et des organismes non-cibles.	Négligeables. Tout effet de ce genre devrait rester comparable à celui des pommes de terre non transgéniques sous façons culturales conventionnelles.	Hautement improbable en raison de la spécificité et du mode d'action des gènes R.	Tout effet sur des organismes non-cibles découlant de la tolérance introduite à <i>P. infestans</i> devrait rester comparable à celui des pommes de terre non transgéniques sous façons culturales conventionnelles. La réduction des besoins en traitements antifongiques pourrait entraîner un accroissement de la microflore non-ciblée.	Programme de surveillance comportant des observations sur la susceptibilité aux maladies et aux parasites.	Effet d'ensemble négligeable.
Effet potentiel sur la santé humaine ou animale des gènes de résistance introduits.	Négligeables. Absence d'effets toxiques ou allergéniques connus des gènes NBS-LRR.	Hautement improbable. Absence d'effets toxiques ou allergéniques connus des gènes NBS-LRR.	Matériel végétal issu des essais non destiné à la consommation humaine ou animale.	Mesures tendant à minimiser tout contact humain ou animal lors de la plantation, de la récolte, de l'entreposage, et du transport.	Effet d'ensemble négligeable.
Effet potentiel sur la santé humaine ou animale des gènes <i>ahas</i> introduits	Négligeables. Absence d'effets toxiques ou allergéniques connus de la protéine AHAS.	Hautement improbable. Absence d'effets toxiques ou allergéniques connus de la protéine AHAS.	Matériel végétal issu des essais non destiné à la consommation humaine ou animale.	Mesures tendant à minimiser tout contact humain ou animal lors de la plantation, de la récolte, de l'entreposage, et du transport.	Effet d'ensemble négligeable.

Effet potentiel sur les processus biogéochimiques (altération du processus de décomposition des matières organiques du sol)	Négligeables. Aucune des protéines exprimées ne devrait s'exsuder dans le sol à partir des plantes.	Hautement improbable. La fertilité du sol ne devrait pas être affectée de façon différente par rapport au cas où des pommes de terre non transgéniques sont cultivées de façon conventionnelle. Aucune des protéines exprimées ne devrait s'exsuder dans le sol à partir des plantes.	Négligeable. Tout effet devrait rester comparable à celui des pommes de terre non transgéniques sous façons culturales conventionnelles. La réduction des besoins en traitements antifongiques pourrait entraîner un accroissement de la microflore du sol.	Aucune.	Effet d'ensemble négligeable.
Effet potentiel sur l'environnement découlant des changements de façons culturales.	Faibles. Effets positifs potentiels sur la microflore du sol, suite à la réduction des traitements antifongiques.	Probable. Aucun changement aux façons culturales excepté la réduction des traitements antifongiques contre <i>P. infestans</i> .	Effets positifs potentiels sur la microflore du sol.	Aucune.	Effet d'ensemble négligeable. Effet positif possible sur la microflore du sol.

## I. Références bibliographiques

**Anderson M., Trifonova A., Andersson A.-B., Johansson M., Bülow L. and Hofvander P. (2003).** A novel selection system for potato transformation using a mutated AHAS gene. – *Plant Cell Rep.* 22:261-267

**Andrivon, D.** 1996. The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: A critical review of the historical and scientific evidence. *Plant Pathol.* 45:1027-1035.

**Ballvora, A., Ercolano, M.R., Weiss, J., Meksem, K., Bormann, C.A., Oberhagemann, P., Salamini, F., and Gebhardt, C. (2002).** The R1 gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. – *Plant J.* 30:361-371

**Bock A-K., Leheureux K., Libeau-Dulos M. Nilsagard H. and Rodiriguez-Cerezo E. (2002).** Scenarios for co-existence of genetically modified, conventional and organic crops in European agriculture. – Institute for Prospective Technological Studies (IPTS), Joint Research Centre.

**Bourke, A.** 1993. 'The Visitation of God'? The Potato and the Great Irish Famine. Lilliput Press, Arbour Hill, Dublin, Ireland.

**Chang A.K. and Duggleby R.G. (1998).** Herbicide-resistant forms of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase: characterization of the catalytic properties and sensitivity to inhibitors of four defined mutants. – *Biochem. J.* 333:765-777

**Dangl, J.L., Dietrich, R.A., and Richberg, M.H.** 1996. Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8, 1793-1807.

**Dangl, J.L. and Jones, J.D.G. (2001).** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. – *Nature* 411:826-833

**Dick, M. W.** 1995. The straminipilous fungi: A new classification for the biflagellate fungi and their uniflagellate relatives with particular reference to Lagenidiaceous fungi. *C.A.B. Int. Mycol. Pap.* 168.

**Eastham K. and Sweet J. (2002).** Genetically modified organisms (GMOs): The significance of gene flow through pollen transfer - European Environment Agency - Environmental issue report No 28

**Eijlander R. and Stiekema W.J. (1994).** Biological containment of potato (*Solanum tuberosum*): outcrossing to the related wild species black nightshade (*Solanum nigrum*) and bittersweet (*Solanum dulcamara*). – *Sex Plant Reprod* 7: 29-40

**Ellis, J., Dodds, P., and Pryor, T.** 2000. The generation of plant disease resistance gene specificities. *Trends Plant Sci.* 5, 373-379.

**Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K.** 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

**Flor, H.H.** 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275- 296.

- Forbes, G. A., Escobar, X. C., Ayala, C. C., Revelo, J., Ordonez, M. E., Fry, B. A., Doucett, K., and Fry, W. E.** 1997. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology* **87**, 375-380.
- Fry, W. E., Goodwin, S. B., Matuszak, J. M., Spielman, L. J., Milgroom, M. G., and Drenth, A.** 1992. Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**, 107-129.
- Fry, W. E., Goodwin, S. B., Dyer, A. T., Matuszak, J. M., Drenth, A., Tooley, P. W., Sujkowski, L. S., Koh, Y. J., Cohen, B. A., Spielman, L. J., Deahl, K. L., Inglis, D. A., and Sandlan, K. P.** 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, pathways, and Implications. *Plant Dis.* **77**, 653-661.
- Hajdukiewicz P., Svab Z. and Maliga P. (1994).** The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. – *Plant Mol. Biol.* **25**:989-994
- Hammond-Kosack, K.E. and Parker J. E. (2003).** Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. – *Current Opinion in Biotechnology* **14**:177-193
- Hawkes J.G.** 1978. Genetic poverty of the potato in Europe. Proc of the Conference on Broadening the Genetic Base of Crops. Pudoc, Wageningen, Netherlands
- Hawkes, J. G.** 1945. The story of the potato. *Discovery* (Feb. 1945), 38-45.
- Heil, M. and Bostock, R.M. (2002).** Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. – *Annals of Botany* **89**:503-512
- Helgeson, J.P., Pohlman, J.D., Austin, S., Haberlach, G.T., Wielgus, S.M., Ronis, D., Zambolim, L., Tooley, P., McGrath, J.M., James, R.V., and Stevenson, W.R.** 1998. Somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and potato: a new source of resistance to late blight. *Theor Appl. Genet* **96**, 738-742
- Hermesen, J.G.Th. and Ramanna, M.S.** 1973. Double-bridge hybrids of *Solanum bulbocastanum* and cultivars of *Solanum tuberosum*. *Euphytica* **22**, 457-466
- Hoekema A., Hirsch P.R., Hooykaas P.J.J. and Schilperoort R.A. (1983).** A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. – *Nature* **303**:179-180
- Hohl, H. R., and Iselin, K.** 1984. Strains of *Phytophthora infestans* with A2 mating type behaviour. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **83**, 529-530
- Hohn B., Koulokilova-Nicola Z., Dürrenberg F., Bakkeren G. and Koncz C. (1991).** The T-DNA on its way from *Agrobacterium tumefaciens* to the plant. - *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions* **1**:19-27.
- Ingham D.J., Beer S., Money S. and Hansen G. (2001).** Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. - *BioTechniques* **31**:132-140
- McPartlan H.C. and Dale P.J. (1994).** An assessment of gene transfer by pollen from field-grown transgenic potatoes to non-transgenic potatoes and related species. – *Transgenic Research* **3**: 216-225

**Meyers, B.C., Morgante, M., and Michelmore, R.W.** 2002. TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in *Arabidopsis* and other plant genomes. *Plant J.* **32**, 77-92.

**Michelmore, R., Meyers, B., Wan, J., Xiaoping, T., Wu A.-J. and Bent, A. (2001).** Functional genomics of NBS-LRR encoding genes in *Arabidopsis*. – Plant & Animal Genome IX Conference, San Diego, CA, January 13-17.

**Niederhauser, J.S., and Mills, W.R.** 1953. Resistance of *Solanum* species to *Phytophthora infestans* in Mexico. *Phytopathology* **43**, 456-457.

**Niederhauser, J. S.** 1991. *Phytophthora infestans*: The Mexican connection. pp 25-45 *In*: *Phytophthora*. J. A. Lucas, R. C. Shattock, D. S. Shaw, and L. R. Cooke, eds. Cambridge University Press, Cambridge.

**OECD (1997).** Consensus Document on the Biology of *Solanum Tuberosum* Subsp. *Tuberosum* (Potato). - Series on the Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 8

**Raybould A.F. and Gray A.J. (1993).** Genetically modified crops and hybridization with wild relatives: a UK perspective. – *Journal of Applied Ecology* 30: 199-219

**Schlüter K., Fütterer J. and Potrykus I. (1995).** Horizontal gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs – if at all – at an extremely low frequency. – *Biotechnology* 13:1094-1098

**Turkensteen L.J.** 1993. Durable resistance of potatoes against *Phytophthora infestans*. *In*: Th. Jacobs and J.E. Parlevliet (eds) *Durability of disease resistance* pp. 115-124. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands

**van den Eede G., Aarts H., Buhk H.-J., Corthier G., Flint H.J., Hammes W., Jacobsen B., Midtvedt T., van der Vossen J., von Wright A., Wackernagel W. and Wilcks A. (2004).** The relevance of gene transfer to the safety of foods and feed derived from genetically modified (GM) plants. – *Food and Chemical Toxicology* 42:1127-1156

**van der Vossen, E.A., Sikkema, A., te Lintel Hekkert, B., Gros, J., Stevens, P., Muskens, M., Wouters, D., Pereira, A., Stiekema, W. and Allefs, S. (2003).** An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. – *Plant J.* 36:867-882

**van der Vossen E.A., Gros J., Sikkema A., Muskens M., Wouters D., Wolters P., Pereira A. and Allefs S. (2005).** The Rpi-blb2 gene from *Solanum bulbocastanum* is an Mi-1 gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato.- *Plant J.* 44:208-222

**Visser, R.G. (1991).** Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. – *In* Lindsey K (ed), *Plant Tissue Culture Manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. B5/1-B5/9

**Wastie, R.L. (1991).** Breeding for resistance. - *Advances in Plant Pathology* 7: 193-224.

**Wouters, D., van der Linden, G., van Eck, H., van der Vossen, E. (2004).** Genome wide mapping and chracterization of NBS-LRR gene analogues in potato; application of the ultra dense genetic map. - Plant and Animal Genomes XII Conference, P575.

**Young, N.D. (2000).** The genetic architecture of resistance. - Current Opinion in Plant Biology 3: 285-290.

**Zambryski P., Holsters M., Kruger K., Depicker A., van Montagu M. and Goodman H.M. (1980).** Tumor DNA structure in plant cells transformed by *A. tumefaciens*. - Science 209:1385-1391.



## ANNEXE 1

On trouvera dans la présente annexe une liste des lignées actuellement disponibles qui seront envisagées pour la dissémination proposée.

### 1. Analyse de confirmation de la présence de l'insert dans les lignées de pommes de terre transformées avec VCPMA16 ou VCPMA19

La présence de l'insert dans les lignées transformées avec VCPMA16 ou VCPMA19 a été confirmée par analyse PCR (réaction de polymérisation en chaîne) en temps réel. Dans le cadre de cette analyse il a été fait appel à un ensemble amorces-sonde visant le gène *ahas* aussi que les gènes *Rpi-blb1* et *Rpi-blb2*. Les réactions PCR ont également comporté un ensemble amorces-sonde visant un gène endogène comme témoin.

Voir les données de l'analyse PCR en temps réel pour le gène *ahas* des *Tableaux 1 et 2* (section "Recherche de l'insert"). L'unité utilisée pour ces données est la valeur Ct, qui est le nombre de cycles PCR à partir duquel la réaction de polymérisation en chaîne donne un résultat distinct du bruit de fond. Le nombre maximum de cycles effectué était de 40. Si la valeur Ct pour le gène *ahas* et la valeur Ct pour le gène témoin endogène ont une différence (dCt) inférieure à 4, l'échantillon est classé positif.

De plus, pour chacune des lignées VCPMA16 et VCPMA19 destinées aux essais en plein champ, la présence des gènes *Rpi-blb1* et *Rpi-blb2* dans l'insert a été confirmée par analyse PCR en temps réel (données non présentées).

### 2. Analyse de la présence des séquences du squelette du vecteur dans les lignées de pommes de terre transformées avec VCPMA16 ou VCPMA19

Les vecteurs VCPMA16 et VCPMA19 ont un squelette dérivé de pPZP200. Ce squelette comporte le gène *aadA* qui code la résistance à la spectinomycine.

La présence de ce squelette pour les lignées transformées avec VCPMA16 ou VCPMA19 est vérifiée par analyse PCR en temps réel, avec deux ensembles amorces-sonde distincts visant l'intérieur du squelette, le premier proche de la limite gauche (LB), et le second proche de la limite droite (RB) (*Figure 1*). L'ensemble amorces-sonde proche de la limite droite vise une séquence du gène *aadA* (résistance à la spectinomycine). Un résultat négatif obtenu avec cet ensemble amorces-sonde indique donc l'absence du gène *aadA*.

Les analyses utilisant un ensemble amorces-sonde visant la séquence d'*aadA* en RB comportaient également des amorces et sonde pour un gène témoin endogène. Si la différence (dCt) des valeurs Ct obtenues pour la séquence RB-*aadA* et pour la séquence témoin est supérieure à 4, l'échantillon est classé négatif (une différence supérieure à 4 correspond à un nombre de copies de la séquence cible de moins de  $0,125(0.5^3)$ ; l'explication de telles valeurs se trouve vraisemblablement dans des micro contaminations intervenues lors de la préparation de l'échantillon ou de la mise en place du protocole expérimental, ou encore quand des valeurs Ct anormalement basses ont été trouvées en l'absence de réelle amplification). Des extraits d'ADN de plants de pomme de terre dont on sait qu'ils contiennent les séquences de squelette recherchées ont été utilisés comme témoins pour confirmer les tests. L'ensemble des lignées

transgéniques transformées avec les constructions génétiques VCPMA16 ou VCPMA19 et listées dans la présente Annexe ont été contrôlées négatives à la présence de la séquence *aadA* au niveau de la limite droite. Voir les données des *Tableaux 1 et 2* (section 'Recherche du squelette').

De la même façon, l'absence de la séquence de squelette visée par l'ensemble amorces-sonde LB a été confirmée pour l'ensemble des lignées transformées par VCPMA16 et VCPMA19 faisant l'objet de la présente notification (données non reproduites).

**Tableau 1.** Données pour les lignées transformées avec la construction génétique VCPMA16

	Lignée n°	Variété mère	Recherche de l'insert				Recherche du squelette			
			Ct AHAS	Ct témoin	dCt	Résultat	Ct RB-aadA	Ct témoin	dCt	Résultat
1	TS-PH05-001-0098	P880	29,16	29,16	0	positive	40,00*	29,05	10,95	negative
2	TS-PH05-001-0100	P880	29,9	28,56	1,34	positive	40,00*	28,37	11,63	negative
3	TS-PH05-002-0003	P698	27,81	27,3	0,5	positive	38,52	27,02	11,51	negative
4	TS-PH05-002-0018	P698	27,25	27	0,26	positive	40,00*	27,49	12,51	negative
5	TS-PH05-002-0055	P698	26,58	26,57	0,01	positive	40,00*	25,51	14,49	negative
6	TS-PH05-002-0082	P698	26,99	27,1	-0,11	positive	40,00*	25,53	14,47	negative
7	TS-PH05-004-0012	P880	28,73	28,16	0,57	positive	40,00*	28,79	11,21	negative
8	TS-PH05-004-0014	P880	26,77	26,19	0,58	positive	40,00*	26,96	13,04	negative
9	TS-PH05-004-0018	P880	28,94	27,37	1,57	positive	40,00*	27,66	12,34	negative
10	TS-PH05-004-0019	P880	28,9	27,7	1,2	positive	40,00*	27,4	12,6	negative
11	TS-PH05-004-0044	P880	29,9	28,22	1,68	positive	40,00*	28,28	11,72	negative
12	TS-PH05-007-0188	P880	27,23	27,63	-0,4	positive	40,00*	28,13	11,87	negative
13	TS-PH05-008-0004	P880	27,28	26,64	0,64	positive	40,00*	26,65	13,35	negative
14	TS-PH05-009-0001	P835	26,71	25,26	1,45	positive	40,00*	25,61	14,39	negative
15	TS-PH05-009-0003	P835	28,6	28,05	0,55	positive	39,04	27,71	11,33	negative
16	TS-PH05-009-0051	P835	32,41	30,73	1,67	positive	40,00*	30,65	9,35	negative
17	TS-PH05-009-0057	P835	33,68	31,67	2,01	positive	40,00*	31,96	8,04	negative
18	TS-PH05-009-0060	P835	28,32	28,27	0,05	positive	36,8	27,37	9,43	negative
19	TS-PH05-009-0061	P835	26,99	25,74	1,25	positive	40,00*	25,62	14,38	negative
20	TS-PH05-009-0070	P835	28,28	28,01	0,27	positive	34,36	27,53	6,83	negative
21	TS-PH05-009-0073	P835	27,5	26,81	0,69	positive	40,00*	27,73	12,27	negative
22	TS-PH05-009-0078	P835	27,78	27,6	0,18	positive	36,36	26,75	9,6	negative
23	TS-PH05-009-0079	P835	28,44	28,11	0,33	positive	38,11	27	11,11	negative
24	TS-PH05-009-0110	P835	28,6	27,92	0,69	positive	39,07	27,74	11,33	negative
25	TS-PH05-009-0131	P835	26,5	25,09	1,41	positive	40,00*	25,39	14,61	negative
26	TS-PH05-009-0133	P835	27,67	26,07	1,6	positive	40,00*	25,84	14,16	negative
27	TS-PH05-009-0163	P835	26,88	25,4	1,48	positive	40,00*	25,76	14,24	negative
28	TS-PH05-009-0168	P835	28,09	27,16	0,93	positive	40,00*	27,01	12,99	negative
29	TS-PH05-009-0174	P835	27,76	25,94	1,82	positive	40,00*	26,14	13,86	negative
30	TS-PH05-009-0186	P835	26,73	25,21	1,51	positive	40,00*	25,55	14,45	negative
31	TS-PH05-009-0200	P835	30,33	29,15	1,18	positive	40,00*	29,46	10,54	negative
32	TS-PH05-009-0207	P835	29,94	28,99	0,95	positive	40,00*	29,73	10,27	negative
33	TS-PH05-009-0209	P835	27,24	25,81	1,43	positive	40,00*	25,62	14,38	negative
34	TS-PH05-009-0216	P835	26,94	27,23	-0,28	positive	38,72	25,77	12,95	negative
35	TS-PH05-010-0002	P835	30,66	29,28	1,38	positive	40,00*	29,54	10,46	negative
36	TS-PH05-010-0023	P835	32,18	30,19	1,99	positive	40,00*	30,75	9,25	negative
37	TS-PH05-010-0032	P835	29,04	28,65	0,38	positive	38,68	28,48	10,2	negative
38	TS-PH05-010-0041	P835	27,22	25,6	1,62	positive	40,00*	25,98	14,02	negative
39	TS-PH05-010-0043	P835	32,07	29,66	2,4	positive	40,00*	30,64	9,36	negative
40	TS-PH05-010-0049	P835	32,34	30,71	1,62	positive	40,00*	30,99	9,01	negative
41	TS-PH05-010-0061	P835	31,53	30,05	1,48	positive	40,00*	30,17	9,83	negative
42	TS-PH05-010-0070	P835	30,82	29,43	1,39	positive	40,00*	29,49	10,51	negative
43	TS-PH05-010-0079	P835	28,75	27,28	1,47	positive	40,00*	27,66	12,34	negative
44	TS-PH05-010-0085	P835	29,14	28,95	0,19	positive	40,00*	28,09	11,91	negative
45	TS-PH05-010-0091	P835	26,8	25,34	1,46	positive	40,00*	25,7	14,3	negative
46	TS-PH05-010-0099	P835	29,52	29,05	0,46	positive	36,68	29	7,68	negative
47	TS-PH05-010-0102	P835	31,71	30,16	1,54	positive	40,00*	30,74	9,26	negative
48	TS-PH05-010-0105	P835	30,43	29,59	0,84	positive	40,00*	29,23	10,77	negative

49	TS-PH05-010-0112	P835	29,79	29,45	0,34	positive	37,33	28,78	8,55	negative
50	TS-PH05-010-0118	P835	27,04	25,4	1,64	positive	40,00*	26,02	13,98	negative
51	TS-PH05-010-0119	P835	30,68	28,97	1,71	positive	40,00*	29,07	10,93	negative
52	TS-PH05-010-0125	P835	29,57	29,4	0,17	positive	37,29	28,93	8,36	negative
53	TS-PH05-010-0137	P835	31,13	31,07	0,06	positive	40,00*	30,36	9,64	negative
54	TS-PH05-010-0142	P835	32,57	30,99	1,58	positive	40,00*	31,13	8,87	negative
55	TS-PH05-010-0150	P835	31,54	30,21	1,33	positive	40,00*	30,54	9,46	negative
56	TS-PH05-010-0152	P835	31,54	29,92	1,62	positive	38,4	30,35	8,05	negative
57	TS-PH05-010-0156	P835	27,01	25,48	1,52	positive	40,00*	25,03	14,97	negative
58	TS-PH05-010-0163	P835	27,74	26,88	0,86	positive	40,00*	26,32	13,68	negative
59	TS-PH05-010-0173	P835	26,25	24,78	1,47	positive	40,00*	25,22	14,78	negative
60	TS-PH05-010-0178	P835	26,41	24,78	1,62	positive	40,00*	25,2	14,8	negative
61	TS-PH05-010-0186	P835	26,23	24,74	1,48	positive	40,00*	25,15	14,85	negative
62	TS-PH05-010-0199	P835	26,45	24,98	1,47	positive	40,00*	24,8	15,2	negative
63	TS-PH05-010-0204	P835	26,98	24,96	2,01	positive	40,00*	26,21	13,79	negative
64	TS-PH05-010-0210	P835	26,63	25,07	1,56	positive	40,00*	25,23	14,77	negative
65	TS-PH05-010-0233	P835	29,42	28,94	0,48	positive	34,38	28,92	5,46	negative
66	TS-PH05-010-0244	P835	28,94	28,51	0,43	positive	40,00*	27,86	12,14	negative
67	TS-PH05-010-0246	P835	28,32	27,61	0,71	positive	36,89	26,41	10,48	negative
68	TS-PH05-010-0248	P835	27,09	25,55	1,54	positive	40,00*	25,54	14,46	negative
69	TS-PH05-010-0299	P835	26,99	25,55	1,43	positive	40,00*	25,96	14,04	negative
70	TS-PH05-010-0300	P835	28,74	28,46	0,28	positive	40,00*	28,11	11,89	negative
71	TS-PH05-010-0303	P835	26,62	25,11	1,51	positive	40,00*	25,65	14,35	negative
72	TS-PH05-010-0316	P835	30,53	30,53	0	positive	38,97	30,12	8,85	negative
73	TS-PH05-010-0327	P835	30,27	29,39	0,88	positive	40,00*	29,18	10,82	negative
74	TS-PH05-010-0329	P835	29,27	28,95	0,32	positive	40,00*	28,66	11,34	negative
75	TS-PH05-010-0332	P835	28,46	27,99	0,47	positive	36,78	27,54	9,24	negative
76	TS-PH05-010-0350	P835	28,87	28,63	0,24	positive	37,87	28,2	9,67	negative
77	TS-PH05-010-0352	P835	28,26	26,42	1,83	positive	40,00*	27,01	12,99	negative
78	TS-PH05-010-0419	P835	27,77	26,13	1,65	positive	40,00*	25,38	14,62	negative
79	TS-PH05-010-0421	P835	28,39	26,83	1,56	positive	40,00*	26,96	13,04	negative
80	TS-PH05-010-0466	P835	26,73	25,2	1,53	positive	40,00*	25,07	14,93	negative
81	TS-PH05-010-0471	P835	27,27	25,51	1,75	positive	40,00*	25,8	14,2	negative
82	TS-PH05-010-0472	P835	27,29	25,67	1,62	positive	40,00*	25,85	14,15	negative
83	TS-PH05-010-0475	P835	27,78	25,78	2,01	positive	40,00*	25,83	14,17	negative
84	TS-PH05-010-0483	P835	26,93	25,41	1,51	positive	39,87	25,29	14,59	negative
85	TS-PH05-010-0485	P835	29	28,29	0,71	positive	40,00*	28,92	11,08	negative
86	TS-PH05-010-0486	P835	27,95	26,79	1,16	positive	40,00*	26,63	13,37	negative
87	TS-PH05-011-0001	P835	28,8	28,67	0,13	positive	37,77	27,88	9,9	negative
88	TS-PH05-011-0002	P835	32,09	30,55	1,55	positive	40,00*	30,91	9,09	negative
89	TS-PH05-011-0005	P835	27,5	26,06	1,44	positive	40,00*	26,88	13,12	negative
90	TS-PH05-011-0007	P835	26,88	25,44	1,44	positive	40,00*	25,28	14,72	negative
91	TS-PH05-011-0022	P835	28,29	28,22	0,07	positive	38,38	27,5	10,88	negative
92	TS-PH05-011-0023	P835	28,17	27,91	0,26	positive	38,78	27,08	11,7	negative
93	TS-PH05-011-0026	P835	28,5	28,46	0,04	positive	40,00*	27,8	12,2	negative
94	TS-PH05-011-0027	P835	27,07	25,09	1,97	positive	40,00*	25,46	14,54	negative
95	TS-PH05-011-0029	P835	26,45	25,04	1,42	positive	40,00*	25,46	14,54	negative
96	TS-PH05-011-0048	P835	26,37	24,96	1,41	positive	40,00*	24,99	15,01	negative
97	TS-PH05-011-0049	P835	27,64	26,77	0,87	positive	40,00*	26,48	13,52	negative
98	TS-PH05-011-0083	P835	29,32	29,09	0,23	positive	40,00*	27,96	12,04	negative
99	TS-PH05-011-0086	P835	27,83	27,5	0,32	positive	40,00*	27,15	12,85	negative
100	TS-PH05-011-0088	P835	26,6	25,1	1,5	positive	40,00*	25,31	14,69	negative
101	TS-PH05-011-0089	P835	26,26	24,88	1,39	positive	38,52	25,24	13,27	negative
102	TS-PH05-011-0093	P835	27,01	25,38	1,64	positive	40,00*	25,59	14,41	negative

103	TS-PH05-011-0098	P835	27,2	25,86	1,34	positive	40,00*	25,94	14,06	negative
104	TS-PH05-011-0110	P835	28,41	27,59	0,82	positive	40,00*	28,36	11,64	negative
105	TS-PH05-011-0119	P835	27,22	25,9	1,32	positive	40,00*	25,53	14,47	negative
106	TS-PH05-011-0122	P835	27,87	27,46	0,41	positive	40,00*	25,28	14,72	negative
107	TS-PH05-011-0124	P835	28,14	26,51	1,64	positive	40,00*	26,42	13,58	negative
108	TS-PH05-011-0144	P835	27,43	26,68	0,75	positive	40,00*	26,81	13,19	negative
109	TS-PH05-011-0148	P835	27,31	25,92	1,38	positive	40,00*	25,52	14,48	negative
110	TS-PH05-011-0149	P835	26,96	25,29	1,67	positive	40,00*	25,51	14,49	negative
111	TS-PH05-011-0170	P835	27,93	27,12	0,81	positive	40,00*	27,73	12,27	negative
112	TS-PH05-012-0008	P880	29,97	29,52	0,45	positive	40,00*	28,91	11,09	negative
113	TS-PH05-012-0020	P880	29,98	29,02	0,97	positive	40,00*	29,03	10,97	negative
114	TS-PH05-012-0040	P880	26,16	26,49	-0,33	positive	37,16	26,61	10,55	negative
115	TS-PH05-012-0104	P880	26,44	25,76	0,68	positive	40,00*	25,92	14,08	negative
116	TS-PH05-013-0018	P698	29,46	28,56	0,9	positive	40,00*	28,57	11,43	negative
117	TS-PH05-014-0007	P880	28,5	27,08	1,42	positive	40,00*	26,98	13,02	negative
118	TS-PH05-014-0008	P880	25,96	25,56	0,4	positive	40,00*	25,71	14,29	negative
119	TS-PH05-014-0009	P880	27,96	26,35	1,61	positive	40,00*	26,08	13,92	negative
120	TS-PH05-014-0010	P880	27,72	27,38	0,34	positive	40,00*	25,92	14,08	negative
121	TS-PH05-014-0011	P880	27,47	27,62	-0,15	positive	40,00*	27,09	12,91	negative
122	TS-PH05-014-0043	P880	27,47	27,77	-0,3	positive	40,00*	27,9	12,1	negative
123	TS-PH05-014-0044	P880	27,16	26,93	0,23	positive	38,26	25,32	12,94	negative
124	TS-PH05-014-0059	P880	32,96	30,76	2,2	positive	40,00*	31,06	8,94	negative
125	TS-PH05-015-0001	P698	31,59	29,88	1,71	positive	40,00*	30,12	9,88	negative
126	TS-PH05-015-0003	P698	32,96	31,03	1,93	positive	40,00*	31,07	8,93	negative
127	TS-PH05-015-0007	P698	27,95	27,29	0,65	positive	40,00*	27,3	12,7	negative
128	TS-PH05-015-0016	P698	32,49	30,49	2	positive	40,00*	30,41	9,59	negative
129	TS-PH05-015-0018	P698	31,57	29,21	2,36	positive	40,00*	29,7	10,3	negative
130	TS-PH05-015-0019	P698	27,93	26,5	1,43	positive	40,00*	26,76	13,24	negative
131	TS-PH05-015-0021	P698	26,59	25,47	1,12	positive	40,00*	25,5	14,5	negative
132	TS-PH05-015-0024	P698	26,38	26,22	0,16	positive	40,00*	24,82	15,18	negative
133	TS-PH05-015-0025	P698	26,92	25,59	1,34	positive	40,00*	25,97	14,03	negative
134	TS-PH05-015-0059	P698	28,38	28,1	0,27	positive	40,00*	27,72	12,28	negative
135	TS-PH05-015-0061	P698	26,33	24,87	1,46	positive	40,00*	24,85	15,15	negative
136	TS-PH05-015-0086	P698	26,93	25,09	1,84	positive	40,00*	25,81	14,19	negative
137	TS-PH05-015-0105	P698	27,19	27,28	-0,09	positive	40,00*	25,04	14,96	negative
138	TS-PH05-015-0123	P698	28,46	27,39	1,07	positive	40,00*	27,2	12,8	negative
139	TS-PH05-015-0128	P698	28,19	28,17	0,02	positive	37,34	26,18	11,16	negative
140	TS-PH05-016-0006	P835	27,76	26,38	1,38	positive	40,00*	26,67	13,33	negative
141	TS-PH05-016-0019	P835	27,44	25,96	1,48	positive	40,00*	26,38	13,62	negative
142	TS-PH05-016-0022	P835	26,97	25,55	1,42	positive	40,00*	25,15	14,85	negative
143	TS-PH05-016-0023	P835	26,77	25,19	1,58	positive	40,00*	25,82	14,18	negative
144	TS-PH05-016-0032	P835	27,66	26,13	1,53	positive	40,00*	26,97	13,03	negative
145	TS-PH05-016-0034	P835	28,8	28,48	0,32	positive	40,00*	27,99	12,01	negative
146	TS-PH05-016-0037	P835	29,96	29,21	0,75	positive	37	28,66	8,34	negative
147	TS-PH05-016-0038	P835	27,48	25,9	1,59	positive	40,00*	26,33	13,67	negative
148	TS-PH05-016-0044	P835	27,78	26,15	1,63	positive	40,00*	26,69	13,31	negative
149	TS-PH05-016-0047	P835	27,1	25,7	1,4	positive	40,00*	26,06	13,94	negative
150	TS-PH05-016-0049	P835	28,56	28	0,56	positive	36,98	27,8	9,18	negative
151	TS-PH05-016-0050	P835	28,68	28,23	0,45	positive	39,83	27,63	12,2	negative
152	TS-PH05-016-0056	P835	27,62	27,23	0,39	positive	34,36	26,84	7,52	negative
153	TS-PH05-016-0057	P835	28,54	28,43	0,11	positive	37,27	28,17	9,1	negative
154	TS-PH05-016-0059	P835	28,66	28,11	0,55	positive	35,54	27,61	7,93	negative
155	TS-PH05-016-0078	P835	28,44	27,99	0,45	positive	39,52	27,49	12,03	negative
156	TS-PH05-016-0099	P835	27,28	26,89	0,39	positive	36,52	26,25	10,27	negative

157	TS-PH05-016-0104	P835	27,39	26,87	0,52	positive	40,00*	27,27	12,73	negative
158	TS-PH05-016-0105	P835	27,17	26,56	0,6	positive	40,00*	27,58	12,42	negative
159	TS-PH05-016-0110	P835	28,99	27,9	1,1	positive	40,00*	28,4	11,6	negative
160	TS-PH05-016-0117	P835	27,61	27,32	0,28	positive	40,00*	25,05	14,95	negative
161	TS-PH05-016-0123	P835	27,75	27,02	0,74	positive	40,00*	27,6	12,4	negative
162	TS-PH05-016-0127	P835	28,08	27,58	0,5	positive	40,00*	28,02	11,98	negative
163	TS-PH05-016-0166	P835	29,05	28,22	0,82	positive	40,00*	28,5	11,5	negative
164	TS-PH05-016-0168	P835	27,62	26,85	0,76	positive	40,00*	26,94	13,06	negative
165	TS-PH05-017-0002	P880	26,84	27,05	-0,21	positive	40,00*	27,13	12,87	negative
166	TS-PH05-017-0004	P880	30,46	29,83	0,63	positive	36,81	29,19	7,62	negative
167	TS-PH05-017-0005	P880	28,22	27,76	0,46	positive	35,17	27,09	8,08	negative
168	TS-PH05-017-0012	P880	27,03	25,8	1,23	positive	40,00*	25,57	14,43	negative
169	TS-PH05-017-0016	P880	29,52	28,02	1,5	positive	40,00*	27,78	12,22	negative
170	TS-PH05-017-0026	P880	27,21	27,04	0,17	positive	40,00*	25,69	14,31	negative
171	TS-PH05-017-0043	P880	27,5	27,43	0,07	positive	40,00*	26,1	13,9	negative
172	TS-PH05-017-0044	P880	31,09	29,61	1,48	positive	40,00*	30	10	negative
173	TS-PH05-017-0056	P880	29,29	27,87	1,42	positive	40,00*	27,73	12,27	negative
174	TS-PH05-017-0058	P880	26,87	26,64	0,23	positive	40,00*	25,53	14,47	negative
175	TS-PH05-017-0093	P880	27,65	26,68	0,97	positive	40,00*	27,27	12,73	negative
176	TS-PH05-017-0096	P880	30,83	29,91	0,91	positive	40,00*	29,8	10,2	negative
177	TS-PH05-018-0011	P698	27,97	26,47	1,5	positive	40,00*	26,94	13,06	negative
178	TS-PH05-018-0027	P698	26,39	25,03	1,37	positive	40,00*	24,74	15,26	negative
179	TS-PH05-018-0028	P698	26,95	25,74	1,22	positive	38,57	25,71	12,85	negative
180	TS-PH05-018-0031	P698	26,71	24,95	1,76	positive	40,00*	25,46	14,54	negative
181	TS-PH05-018-0039	P698	27,92	27,86	0,06	positive	38,58	25,91	12,68	negative
182	TS-PH05-018-0046	P698	27,42	25,95	1,47	positive	40,00*	26,1	13,9	negative
183	TS-PH05-018-0059	P698	27,24	25,88	1,35	positive	40,00*	26,35	13,65	negative
184	TS-PH05-018-0062	P698	29,09	28,33	0,75	positive	38,14	28,09	10,05	negative
185	TS-PH05-018-0082	P698	26,95	25,38	1,57	positive	40,00*	25,7	14,3	negative
186	TS-PH05-018-0092	P698	27,31	26,04	1,27	positive	40,00*	25,76	14,24	negative
187	TS-PH05-018-0093	P698	26,8	26,87	-0,07	positive	40,00*	25,22	14,78	negative
188	TS-PH05-018-0096	P698	26,61	26,59	0,02	positive	40,00*	24,7	15,3	negative
189	TS-PH05-018-0100	P698	29,94	28,99	0,96	positive	40,00*	29,13	10,87	negative
190	TS-PH05-018-0104	P698	28,67	28,07	0,59	positive	40,00*	27,94	12,06	negative
191	TS-PH05-018-0117	P698	28,54	26,88	1,66	positive	40,00*	27,14	12,86	negative
192	TS-PH05-018-0118	P698	28,12	26,36	1,76	positive	40,00*	26,49	13,51	negative
193	TS-PH05-018-0120	P698	27,75	26,07	1,68	positive	40,00*	25,93	14,07	negative
194	TS-PH05-018-0125	P698	27,59	27,49	0,1	positive	40,00*	25,81	14,19	negative
195	TS-PH05-018-0133	P698	28,74	28,07	0,66	positive	40,00*	27,98	12,02	negative
196	TS-PH05-018-0134	P698	27,55	26,11	1,43	positive	40,00*	25,9	14,1	negative
197	TS-PH05-018-0137	P698	27,78	26,08	1,7	positive	40,00*	26,28	13,72	negative
198	TS-PH05-018-0147	P698	29,4	28,6	0,8	positive	40,00*	28,61	11,39	negative
199	TS-PH05-018-0149	P698	29,08	28,28	0,8	positive	40,00*	28,46	11,54	negative
200	TS-PH05-018-0152	P698	29,76	28,75	1,01	positive	40,00*	28,27	11,73	negative
201	TS-PH05-018-0180	P698	28,45	27,49	0,96	positive	40,00*	27,42	12,58	negative
202	TS-PH05-018-0192	P698	28,74	27,85	0,89	positive	40,00*	27,83	12,17	negative
203	TS-PH05-018-0239	P698	29,21	27,94	1,27	positive	40,00*	28,38	11,62	negative
204	TS-PH05-018-0253	P698	29,15	28,38	0,78	positive	40,00*	27,71	12,29	negative
205	TS-PH05-018-0260	P698	28,58	27,72	0,86	positive	40,00*	27,78	12,22	negative
206	TS-PH05-019-0006	P698	29,15	29,01	0,14	positive	38,27	28,31	9,96	negative
207	TS-PH05-019-0023	P698	27,6	26,05	1,55	positive	40,00*	26,35	13,65	negative
208	TS-PH05-019-0025	P698	27,19	25,78	1,41	positive	40,00*	25,41	14,59	negative
209	TS-PH05-019-0046	P698	27,51	25,87	1,64	positive	40,00*	25,7	14,3	negative
210	TS-PH05-019-0047	P698	27,48	26,14	1,34	positive	38,8	25,84	12,95	negative

211	TS-PH05-019-0051	P698	28,41	27,24	1,17	positive	40,00*	26,86	13,14	negative
212	TS-PH05-020-0002	P698	27,67	26,69	0,99	positive	40,00*	26,41	13,59	negative
213	TS-PH05-020-0018	P698	27,87	27,13	0,74	positive	36,21	27,21	8,99	negative
214	TS-PH05-020-0019	P698	28,69	28,23	0,47	positive	36,98	27,91	9,07	negative
215	TS-PH05-020-0020	P698	28,8	28,39	0,41	positive	38,05	27,67	10,38	negative
216	TS-PH05-020-0030	P698	28,13	27,72	0,41	positive	33,91	27,25	6,66	negative
217	TS-PH05-020-0031	P698	27,94	26,25	1,69	positive	40,00*	26,06	13,94	negative
218	TS-PH05-020-0032	P698	26,55	25,09	1,46	positive	40,00*	25,34	14,66	negative
219	TS-PH05-020-0033	P698	27,43	26,59	0,84	positive	40,00*	26,85	13,15	negative
220	TS-PH05-020-0034	P698	27,05	25,52	1,53	positive	40,00*	25,47	14,53	negative
221	TS-PH05-020-0040	P698	27,98	26,56	1,42	positive	40,00*	26,93	13,07	negative
222	TS-PH05-020-0043	P698	27,44	27,29	0,16	positive	40,00*	26,02	13,98	negative
223	TS-PH05-020-0075	P698	27,37	27,01	0,36	positive	40,00*	24,96	15,04	negative
224	TS-PH05-020-0084	P698	27,37	26,52	0,84	positive	40,00*	26,64	13,36	negative
225	TS-PH05-022-0007	P698	29,4	29,1	0,3	positive	36,4	28,26	8,14	negative
226	TS-PH05-022-0013	P698	27,8	26,28	1,52	positive	40,00*	26,25	13,75	negative
227	TS-PH05-022-0015	P698	26,56	24,8	1,76	positive	40,00*	25,32	14,68	negative
228	TS-PH05-022-0019	P698	28,21	27,57	0,64	positive	40,00*	25,72	14,28	negative
229	TS-PH05-022-0020	P698	27,97	27,74	0,23	positive	40,00*	25,63	14,37	negative
230	TS-PH05-023-0003	P880	27,44	25,91	1,53	positive	40,00*	25,88	14,12	negative
231	TS-PH05-023-0005	P880	28,01	26,17	1,84	positive	40,00*	25,99	14,01	negative
232	TS-PH05-025-0014	P698	27,77	26,55	1,21	positive	40,00*	27,14	12,86	negative
233	TS-PH05-025-0015	P698	27,61	27,62	-0,01	positive	40,00*	25,93	14,07	negative
234	TS-PH05-025-0019	P698	27,51	26,71	0,79	positive	40,00*	26,53	13,47	negative
235	TS-PH05-025-0037	P698	26,99	25,77	1,22	positive	40,00*	25,25	14,75	negative
236	TS-PH05-025-0038	P698	28,56	26,96	1,6	positive	40,00*	26,81	13,19	negative
237	TS-PH05-025-0046	P698	27,61	28	-0,39	positive	40,00*	26,22	13,78	negative
238	TS-PH05-025-0048	P698	27,13	27,17	-0,04	positive	40,00*	25,48	14,52	negative
239	TS-PH05-025-0064	P698	27,15	25,74	1,4	positive	40,00*	25,62	14,38	negative
240	TS-PH05-025-0067	P698	27,22	25,38	1,83	positive	40,00*	25,74	14,26	negative
241	TS-PH05-025-0090	P698	27,45	26,9	0,54	positive	40,00*	27,04	12,96	negative
242	TS-PH05-025-0092	P698	28,1	27,04	1,06	positive	40,00*	26,97	13,03	negative
243	TS-PH05-025-0093	P698	26,8	26,59	0,21	positive	39,14	25,27	13,87	negative
244	TS-PH05-025-0096	P698	27,63	26,82	0,81	positive	40,00*	26,92	13,08	negative
245	TS-PH05-025-0134	P698	27,56	27,21	0,35	positive	40,00*	25,26	14,74	negative
246	TS-PH05-025-0174	P698	26,96	26,11	0,85	positive	40,00*	26,12	13,88	negative
247	TS-PH05-025-0193	P698	26,91	26,72	0,19	positive	40,00*	25,02	14,98	negative
248	TS-PH05-025-0194	P698	27,79	26,96	0,83	positive	40,00*	26,72	13,28	negative
249	TS-PH05-025-0210	P698	28	27,99	0,01	positive	38,36	25,39	12,97	negative
250	TS-PH05-026-0002	P880	27,42	27,28	0,15	positive	40,00*	25,08	14,92	negative
251	TS-PH05-026-0025	P880	27,3	27,42	-0,12	positive	40,00*	25,66	14,34	negative
252	TS-PH05-026-0026	P880	31,04	29,64	1,4	positive	40,00*	29,7	10,3	negative
253	TS-PH05-026-0048	P880	32,2	31,75	0,45	positive	40,00*	30,02	9,98	negative
254	TS-PH05-026-0066	P880	29,06	27,6	1,47	positive	40,00*	28,05	11,95	negative
255	TS-PH05-026-0069	P880	30,6	28,89	1,71	positive	40,00*	29,35	10,65	negative
256	TS-PH05-026-0091	P880	27,53	27,77	-0,24	positive	40,00*	27,73	12,27	negative
257	TS-PH05-027-0062	P880	29,39	29,7	-0,31	positive	40,00*	27,83	12,17	negative
258	TS-PH05-027-0085	P880	28,67	27,2	1,47	positive	40,00*	26,81	13,19	negative
259	TS-PH05-028-0011	P880	27,46	27,34	0,12	positive	40,00*	25,39	14,61	negative
260	TS-PH05-028-0030	P880	27,69	27,57	0,12	positive	40,00*	27,48	12,52	negative
261	TS-PH05-028-0032	P880	29,79	29,76	0,03	positive	40,00*	29,66	10,34	negative
262	TS-PH05-030-0009	P698	26,82	25,86	0,96	positive	40,00*	26,12	13,88	negative
263	TS-PH05-030-0015	P698	27,97	27,63	0,34	positive	40,00*	25,49	14,51	negative
264	TS-PH05-030-0020	P698	27,34	27,09	0,25	positive	40,00*	25,64	14,36	negative

265	TS-PH05-030-0023	P698	26,5	26,67	-0,17	positive	40,00*	24,64	15,36	negative
266	TS-PH05-030-0030	P698	28,06	27,06	0,99	positive	40,00*	27,1	12,9	negative
267	TS-PH05-030-0034	P698	26,49	25,97	0,52	positive	40,00*	25,76	14,24	negative
268	TS-PH05-030-0042	P698	28,89	27,96	0,92	positive	40,00*	28,68	11,32	negative
269	TS-PH05-030-0075	P698	28,65	28,23	0,42	positive	40,00*	26	14	negative
270	TS-PH05-030-0085	P698	27,89	27,04	0,86	positive	40,00*	26,7	13,3	negative
271	TS-PH05-033-0006	P880	27,54	27,25	0,28	positive	40,00*	27,76	12,24	negative
272	TS-PH05-033-0009	P880	28,98	27,63	1,35	positive	40,00*	26,99	13,01	negative
273	TS-PH05-034-0004	P698	26,77	25,36	1,41	positive	40,00*	24,92	15,08	negative
274	TS-PH05-034-0026	P698	27,3	26,41	0,89	positive	40,00*	25,91	14,09	negative
275	TS-PH05-035-0006	P698	27,6	25,95	1,65	positive	40,00*	25,85	14,15	negative
276	TS-PH05-035-0015	P698	28,55	27,47	1,08	positive	40,00*	27,14	12,86	negative
277	TS-PH05-035-0018	P698	26,91	26,72	0,19	positive	40,00*	25,46	14,54	negative
278	TS-PH05-035-0019	P698	27,16	27,04	0,12	positive	37,21	25,92	11,3	negative
279	TS-PH05-036-0003	P835	32,79	31,18	1,61	positive	40,00*	31,24	8,76	negative
280	TS-PH05-036-0007	P835	28,18	28,02	0,16	positive	35,46	26,89	8,57	negative
281	TS-PH05-036-0011	P835	28,19	27,73	0,47	positive	40,00*	26,79	13,21	negative
282	TS-PH05-036-0012	P835	29,1	28,37	0,74	positive	38,4	28	10,4	negative
283	TS-PH05-036-0015	P835	28,23	27,63	0,6	positive	36,88	27,29	9,59	negative
284	TS-PH05-036-0016	P835	31,19	29,3	1,89	positive	40,00*	29,96	10,04	negative
285	TS-PH05-036-0017	P835	26,75	25,13	1,62	positive	40,00*	25,35	14,65	negative
286	TS-PH05-036-0018	P835	27,2	26,99	0,21	positive	40,00*	26,84	13,16	negative
287	TS-PH05-036-0020	P835	28,59	28	0,59	positive	34,59	28,02	6,57	negative
288	TS-PH05-036-0026	P835	28,95	28,38	0,57	positive	40,00*	28,07	11,93	negative
289	TS-PH05-036-0031	P835	31,01	30,5	0,51	positive	39,02	30,09	8,93	negative
290	TS-PH05-036-0034	P835	27,51	26,19	1,32	positive	40,00*	26,39	13,61	negative
291	TS-PH05-036-0044	P835	27,23	25,43	1,8	positive	40,00*	25,73	14,27	negative
292	TS-PH05-036-0051	P835	27,76	26,09	1,66	positive	40,00*	26,07	13,93	negative
293	TS-PH05-036-0074	P835	28,09	27,97	0,12	positive	40,00*	26,99	13,01	negative
294	TS-PH05-036-0075	P835	27,84	27,61	0,23	positive	34,01	27,03	6,98	negative
295	TS-PH05-036-0081	P835	28,8	28,01	0,79	positive	40,00*	28,25	11,75	negative
296	TS-PH05-036-0082	P835	26,79	24,9	1,89	positive	40,00*	25,32	14,68	negative
297	TS-PH05-036-0089	P835	26,79	25,43	1,36	positive	40,00*	25,6	14,4	negative
298	TS-PH05-036-0118	P835	27,58	25,65	1,93	positive	40,00*	26,02	13,98	negative
299	TS-PH05-036-0148	P835	27,44	26,04	1,4	positive	40,00*	26,37	13,63	negative
300	TS-PH05-037-0002	P880	29,25	28,67	0,58	positive	40,00*	28,06	11,94	negative
301	TS-PH05-037-0003	P880	27,1	25,88	1,22	positive	40,00*	25,75	14,25	negative
302	TS-PH05-037-0005	P880	26,99	26,28	0,71	positive	40,00*	26,28	13,72	negative
303	TS-PH05-037-0007	P880	27,52	25,83	1,69	positive	40,00*	26,44	13,56	negative
304	TS-PH05-037-0011	P880	28,94	26,55	2,39	positive	40,00*	26,95	13,05	negative
305	TS-PH05-037-0020	P880	27,58	25,86	1,72	positive	40,00*	25,25	14,75	negative
306	TS-PH05-037-0022	P880	28,22	26,99	1,23	positive	40,00*	27,6	12,4	negative
307	TS-PH05-037-0026	P880	27,25	27,54	-0,29	positive	40,00*	28,15	11,85	negative
308	TS-PH05-037-0033	P880	28,24	27,06	1,17	positive	40,00*	26,89	13,11	negative
309	TS-PH05-037-0039	P880	27,44	27,67	-0,23	positive	40,00*	25,65	14,35	negative
310	TS-PH05-037-0045	P880	26,6	26,46	0,14	positive	40,00*	24,75	15,25	negative
311	TS-PH05-037-0054	P880	32,05	30,43	1,62	positive	40,00*	30,14	9,86	negative
312	TS-PH05-037-0068	P880	29,48	28	1,48	positive	40,00*	27,63	12,37	negative
313	TS-PH05-037-0079	P880	27,88	26,48	1,4	positive	40,00*	26,6	13,4	negative
314	TS-PH05-037-0096	P880	29,42	28,83	0,6	positive	40,00*	29,81	10,19	negative
315	TS-PH05-037-0097	P880	32,47	32,02	0,46	positive	40,00*	30,68	9,32	negative
316	TS-PH05-037-0116	P880	30,28	28,81	1,47	positive	40,00*	28,93	11,07	negative
317	TS-PH05-037-0118	P880	29,26	28,46	0,8	positive	40,00*	28,71	11,29	negative
318	TS-PH05-037-0135	P880	27,74	26,54	1,2	positive	40,00*	26,41	13,59	negative



319	TS-PH05-037-0138	P880	27,63	27,29	0,35	positive	40,00*	25,48	14,52	negative
320	TS-PH05-037-0147	P880	28,49	28,19	0,3	positive	40,00*	25,49	14,51	negative
321	TS-PH05-037-0149	P880	26,68	26,67	0,01	positive	38,14	25,38	12,76	negative
322	TS-PH05-037-0153	P880	27,83	27,74	0,09	positive	40,00*	26,39	13,61	negative
323	TS-PH05-037-0157	P880	26,68	26,45	0,23	positive	40,00*	27,3	12,7	negative
324	TS-PH05-037-0199	P880	27,99	27,46	0,53	positive	40,00*	27,58	12,42	negative
325	TS-PH05-037-0207	P880	26,79	26,59	0,19	positive	40,00*	26,83	13,17	negative
326	TS-PH05-037-0215	P880	27,26	27,2	0,07	positive	40,00*	27,73	12,27	negative
327	TS-PH05-037-0244	P880	26	25,51	0,49	positive	40,00*	25,82	14,18	negative
328	TS-PH05-037-0281	P880	30,15	29	1,16	positive	40,00*	28,1	11,9	negative
329	TS-PH05-037-0296	P880	26,01	25,54	0,47	positive	40,00*	25,53	14,47	negative
330	TS-PH05-037-0303	P880	30,4	28,81	1,59	positive	40,00*	28,83	11,17	negative
331	TS-PH05-037-0432	P880	30,72	29,39	1,33	positive	40,00*	29,39	10,61	negative
332	TS-PH05-037-0436	P880	30,07	29,75	0,32	positive	40,00*	29,15	10,85	negative
333	TS-PH05-037-0441	P880	31,44	30,28	1,15	positive	40,00*	30,44	9,56	negative
334	TS-PH05-037-0448	P880	27,76	27,44	0,32	positive	40,00*	27,1	12,9	negative
335	TS-PH05-037-0449	P880	30,65	30,45	0,2	positive	40,00*	29,95	10,05	negative
336	TS-PH05-037-0457	P880	26,97	26,51	0,46	positive	40,00*	26,7	13,3	negative
337	TS-PH05-037-0506	P880	32,13	30,65	1,48	positive	40,00*	27,95	12,05	negative
	neg ctrl, P698		40,00*	27,79	12,21	negative	35,23	25,26	9,97	negative
	neg ctrl, P698		36,65	25,17	11,48	negative	40,00*	27,71	12,29	negative
	neg ctrl, P698		38,24	31,14	7,10	negative	36,75	27,73	9,02	negative
	neg ctrl, P698		37,40	29,12	8,28	negative	37,30	28,87	8,43	negative
	neg ctrl, P698		40,00*	30,02	9,98	negative	38,98	27,99	11,00	negative
	neg ctrl, P835		40,00*	25,46	14,54	negative	40,00*	27,13	12,87	negative
	neg ctrl, P835		40,00*	26,43	13,57	negative	36,17	29,55	6,62	negative
	neg ctrl, P835		39,27	28,93	10,34	negative	40,00*	28,76	11,24	negative
	neg ctrl, P835		37,44	27,87	9,57	negative	36,23	28,50	7,73	negative
	neg ctrl, P835		35,69	26,69	9,00	negative	38,88	30,65	8,23	negative
	neg ctrl, P880		34,86	27,83	7,03	negative	40,00*	27,94	12,06	negative
	neg ctrl, P880		40,00*	27,36	12,64	negative	40,00*	26,25	13,75	negative
	neg ctrl, P880		40,00*	25,71	14,29	negative	35,15	27,11	8,03	negative
	neg ctrl, P880		37,98	29,60	8,37	negative	38,20	28,59	9,60	negative
	ctrl with backbone		-	-	-	-	27,32	25,98	1,35	positive
	ctrl with backbone		-	-	-	-	27,63	26,08	1,55	positive
	ctrl with backbone		-	-	-	-	27,11	26,90	0,21	positive
	ctrl with backbone		-	-	-	-	27,15	26,07	1,08	positive
	ctrl with backbone		-	-	-	-	28,61	28,52	0,09	positive
	ctrl with backbone		-	-	-	-	28,69	28,22	0,47	positive
	ctrl with backbone		-	-	-	-	27,59	26,31	1,28	positive
	ctrl with backbone		-	-	-	-	26,67	27,00	-0,33	positive
	ctrl with backbone		-	-	-	-	26,62	25,71	0,91	positive
	ctrl with backbone		-	-	-	-	26,61	25,81	0,81	positive
	ctrl with backbone		-	-	-	-	26,36	25,69	0,67	positive
	ctrl with backbone		-	-	-	-	26,99	25,60	1,39	positive
	ctrl with backbone		-	-	-	-	26,47	25,93	0,54	positive
	ctrl with backbone		-	-	-	-	28,25	29,09	-0,85	positive
	ctrl with backbone		-	-	-	-	28,07	28,28	-0,21	positive
										* Aucun signal détecté après 40 cycles

**Tableau 2.** Données pour les lignées transformées avec la construction génétique VCPMA19

	Lignée n°	Variété mère	Recherche de l'insert				Recherche du squelette			
			Ct AHAS	Ct témoin	dCt	Résultat	Ct RB-aadA	Ct témoin	dCt	Résultat
338	TS-PH05-038-0023	P698	27,65	26,76	0,89	positive	40,00*	27,17	12,83	negative
339	TS-PH05-038-0029	P698	28,91	28,01	0,9	positive	40,00*	28,21	11,79	negative
340	TS-PH05-038-0034	P698	27,06	27,02	0,04	positive	35,95	25,58	10,37	negative
341	TS-PH05-038-0035	P698	27,22	26,96	0,26	positive	40,00*	25,07	14,93	negative
342	TS-PH05-038-0036	P698	27,37	26,74	0,63	positive	40,00*	26,76	13,24	negative
343	TS-PH05-038-0038	P698	27,93	27,75	0,18	positive	39,64	26,15	13,49	negative
344	TS-PH05-038-0043	P698	28,18	27,7	0,47	positive	40,00*	27,4	12,6	negative
345	TS-PH05-038-0067	P698	32,71	31,85	0,86	positive	40,00*	31,96	8,04	negative
346	TS-PH05-038-0068	P698	32,53	31,11	1,42	positive	40,00*	30,65	9,35	negative
347	TS-PH05-038-0071	P698	30,43	28,94	1,5	positive	40,00*	28,63	11,37	negative
348	TS-PH05-038-0087	P698	29,81	28,54	1,27	positive	40,00*	27,86	12,14	negative
349	TS-PH05-038-0105	P698	26,77	27,08	-0,31	positive	39,39	27,02	12,37	negative
350	TS-PH05-038-0107	P698	26,51	26,68	-0,16	positive	40,00*	26,62	13,38	negative
351	TS-PH05-038-0131	P698	27,43	27,39	0,04	positive	40,00*	27,6	12,4	negative
352	TS-PH05-038-0143	P698	26,41	26,44	-0,03	positive	40,00*	26,71	13,29	negative
353	TS-PH05-038-0145	P698	27,06	27,53	-0,48	positive	40,00*	27,17	12,83	negative
354	TS-PH05-038-0161	P698	27,65	27,19	0,46	positive	40,00*	26,96	13,04	negative
355	TS-PH05-038-0166	P698	27,05	26,4	0,65	positive	40,00*	26,48	13,52	negative
356	TS-PH05-038-0176	P698	26,73	25,8	0,93	positive	40,00*	26,26	13,74	negative
357	TS-PH05-038-0183	P698	29,27	27,94	1,33	positive	40,00*	27,24	12,76	negative
358	TS-PH05-038-0184	P698	29,66	28,05	1,61	positive	40,00*	27,3	12,7	negative
359	TS-PH05-038-0206	P698	29,23	27,5	1,73	positive	40,00*	27,7	12,3	negative
360	TS-PH05-038-0230	P698	30,65	29,07	1,58	positive	40,00*	26,71	13,29	negative
361	TS-PH05-039-0004	P698	26,99	26,83	0,16	positive	38,3	25,68	12,62	negative
362	TS-PH05-039-0008	P698	27,57	26,99	0,58	positive	40,00*	27,06	12,94	negative
363	TS-PH05-039-0013	P698	27	26,35	0,65	positive	40,00*	27,12	12,88	negative
364	TS-PH05-039-0029	P698	27,42	26,58	0,84	positive	40,00*	26,43	13,57	negative
365	TS-PH05-039-0038	P698	27,52	27,1	0,42	positive	40,00*	25,62	14,38	negative
366	TS-PH05-039-0039	P698	26,89	26,78	0,1	positive	40,00*	24,97	15,03	negative
367	TS-PH05-039-0044	P698	27,2	27,01	0,2	positive	40,00*	25,15	14,85	negative
368	TS-PH05-039-0053	P698	28,16	27,91	0,25	positive	40,00*	27,77	12,23	negative
369	TS-PH05-039-0054	P698	26,32	26,3	0,02	positive	35,7	25,34	10,37	negative
370	TS-PH05-039-0064	P698	27,86	27,83	0,03	positive	40,00*	25,78	14,22	negative
371	TS-PH05-039-0077	P698	27,59	27,62	-0,02	positive	40,00*	25,62	14,38	negative
372	TS-PH05-039-0079	P698	27,02	26,95	0,06	positive	40,00*	25,14	14,86	negative
373	TS-PH05-039-0084	P698	26,86	26,83	0,03	positive	40,00*	26,73	13,27	negative
374	TS-PH05-039-0092	P698	26,06	26,04	0,02	positive	40,00*	26,29	13,71	negative
375	TS-PH05-039-0093	P698	27,37	27,71	-0,34	positive	40,00*	27,7	12,3	negative
376	TS-PH05-039-0096	P698	26,98	27,19	-0,22	positive	40,00*	27,1	12,9	negative
377	TS-PH05-039-0102	P698	26,62	25,98	0,64	positive	40,00*	26,42	13,58	negative
378	TS-PH05-039-0103	P698	28,69	27,24	1,45	positive	40,00*	27,06	12,94	negative
379	TS-PH05-039-0105	P698	28,24	26,76	1,48	positive	40,00*	25,99	14,01	negative
380	TS-PH05-039-0106	P698	28,14	27,61	0,53	positive	40,00*	27,44	12,56	negative
381	TS-PH05-039-0116	P698	27,82	27,1	0,72	positive	40,00*	26,99	13,01	negative
382	TS-PH05-039-0118	P698	31,39	29,99	1,4	positive	40,00*	26,33	13,67	negative
383	TS-PH05-039-0119	P698	29,94	28,41	1,53	positive	40,00*	26,77	13,23	negative
384	TS-PH05-039-0134	P698	27,17	26,32	0,85	positive	40,00*	26,56	13,44	negative
385	TS-PH05-039-0136	P698	26,47	26,32	0,15	positive	40,00*	26,46	13,54	negative

386	TS-PH05-039-0139	P698	28,07	26,83	1,24	positive	40,00*	25,41	14,59	negative
387	TS-PH05-040-0004	P698	26,82	25,54	1,28	positive	40,00*	25,31	14,69	negative
388	TS-PH05-040-0005	P698	30,01	29,01	1	positive	40,00*	28,43	11,57	negative
389	TS-PH05-040-0010	P698	29,21	29,23	-0,02	positive	40,00*	27,23	12,77	negative
390	TS-PH05-040-0014	P698	28,8	27,84	0,96	positive	40,00*	27,5	12,5	negative
391	TS-PH05-040-0022	P698	29,8	29,06	0,73	positive	40,00*	28,61	11,39	negative
392	TS-PH05-040-0023	P698	30,81	29,21	1,6	positive	40,00*	29,77	10,23	negative
393	TS-PH05-040-0025	P698	29,39	27,86	1,53	positive	40,00*	27,83	12,17	negative
394	TS-PH05-040-0044	P698	28,95	27,54	1,41	positive	40,00*	27,5	12,5	negative
395	TS-PH05-040-0048	P698	27,29	27,29	0	positive	40,00*	27,73	12,27	negative
396	TS-PH05-040-0051	P698	29,7	28,45	1,25	positive	40,00*	28,15	11,85	negative
397	TS-PH05-040-0055	P698	29,75	28,58	1,17	positive	40,00*	28,53	11,47	negative
398	TS-PH05-040-0070	P698	28,36	28,54	-0,18	positive	40,00*	28,53	11,47	negative
399	TS-PH05-040-0092	P698	27,62	27,71	-0,09	positive	40,00*	27,37	12,63	negative
400	TS-PH05-040-0101	P698	26,28	25,65	0,63	positive	40,00*	25,81	14,19	negative
401	TS-PH05-040-0134	P698	29,46	27,56	1,9	positive	40,00*	28,06	11,94	negative
402	TS-PH05-040-0140	P698	26,12	25,56	0,56	positive	40,00*	26,11	13,89	negative
403	TS-PH05-040-0141	P698	27,09	26,13	0,96	positive	40,00*	26,86	13,14	negative
404	TS-PH05-040-0148	P698	28,62	26,69	1,93	positive	40,00*	27,9	12,1	negative
405	TS-PH05-040-0151	P698	29,56	28,02	1,53	positive	40,00*	27,89	12,11	negative
406	TS-PH05-040-0168	P698	29,05	27,25	1,8	positive	40,00*	29,04	10,96	negative
407	TS-PH05-040-0188	P698	29,65	28,16	1,49	positive	40,00*	26,32	13,68	negative
408	TS-PH05-040-0194	P698	27,19	26,36	0,83	positive	40,00*	27,97	12,03	negative
409	TS-PH05-040-0244	P698	31,03	29,3	1,73	positive	40,00*	28,76	11,24	negative
410	TS-PH05-040-0270	P698	27,51	27	0,51	positive	40,00*	27,8	12,2	negative
411	TS-PH05-040-0271	P698	30,47	29,37	1,1	positive	40,00*	27,29	12,71	negative
412	TS-PH05-040-0314	P698	29,07	27,16	1,91	positive	40,00*	26,85	13,15	negative
413	TS-PH05-040-0316	P698	28,74	26,93	1,81	positive	40,00*	27,24	12,76	negative
414	TS-PH05-040-0322	P698	29,25	28,82	0,43	positive	40,00*	28,06	11,94	negative
415	TS-PH05-040-0327	P698	31,07	30,71	0,36	positive	40,00*	27,53	12,47	negative
416	TS-PH05-040-0330	P698	29,29	29	0,29	positive	40,00*	27,14	12,86	negative
417	TS-PH05-040-0343	P698	29,56	29,31	0,25	positive	40,00*	27,24	12,76	negative
418	TS-PH05-040-0347	P698	29,15	28,69	0,46	positive	40,00*	27,92	12,08	negative
419	TS-PH05-040-0349	P698	29,95	29,55	0,4	positive	40,00*	26,3	13,7	negative
420	TS-PH05-041-0002	P698	27,48	26,82	0,66	positive	40,00*	26,85	13,15	negative
421	TS-PH05-041-0004	P698	27,27	26,49	0,78	positive	40,00*	26,62	13,38	negative
422	TS-PH05-041-0008	P698	29,69	28,8	0,89	positive	40,00*	28,93	11,07	negative
423	TS-PH05-041-0012	P698	30	28,86	1,14	positive	40,00*	28,75	11,25	negative
424	TS-PH05-041-0014	P698	27,31	27,11	0,2	positive	40,00*	27,46	12,54	negative
425	TS-PH05-041-0017	P698	28,29	28,02	0,27	positive	40,00*	28,31	11,69	negative
426	TS-PH05-041-0020	P698	29,73	27,91	1,82	positive	40,00*	27,44	12,56	negative
427	TS-PH05-041-0035	P698	31,8	29,85	1,95	positive	40,00*	26,41	13,59	negative
428	TS-PH05-041-0056	P698	29,3	27,49	1,81	positive	40,00*	25,83	14,17	negative
429	TS-PH05-041-0062	P698	27,19	26,58	0,61	positive	40,00*	28,08	11,92	negative
430	TS-PH05-041-0068	P698	26,2	25,49	0,71	positive	40,00*	25,87	14,13	negative
431	TS-PH05-041-0072	P698	29,04	27,12	1,92	positive	40,00*	27,22	12,78	negative
432	TS-PH05-041-0092	P698	27,96	27,6	0,36	positive	40,00*	28,99	11,01	negative
433	TS-PH05-041-0095	P698	27,98	27,4	0,58	positive	40,00*	27,65	12,35	negative
434	TS-PH05-041-0102	P698	30,78	28,89	1,89	positive	40,00*	28,35	11,65	negative
435	TS-PH05-041-0170	P698	30,22	29	1,22	positive	40,00*	26,85	13,15	negative
436	TS-PH05-041-0236	P698	30,49	28,83	1,66	positive	40,00*	27,53	12,47	negative
437	TS-PH05-042-0001	P835	27,29	26,4	0,9	positive	40,00*	26,6	13,4	negative
438	TS-PH05-042-0002	P835	26,84	26,29	0,54	positive	40,00*	26,56	13,44	negative
439	TS-PH05-042-0003	P835	28,34	27,13	1,21	positive	40,00*	27,07	12,93	negative

440	TS-PH05-042-0004	P835	27,72	26,86	1,28	positive	40,00*	27,02	14,69	negative
441	TS-PH05-042-0007	P835	28,37	27,28	1,08	positive	40,00*	27,26	12,74	negative
442	TS-PH05-042-0019	P835	29,09	27,94	1,15	positive	40,00*	27,53	12,47	negative
443	TS-PH05-042-0025	P835	28,09	26,78	1,31	positive	40,00*	26,9	13,1	negative
444	TS-PH05-042-0035	P835	29,24	28,1	1,14	positive	40,00*	28,01	11,99	negative
445	TS-PH05-042-0036	P835	29,38	27,83	1,55	positive	40,00*	28,08	11,92	negative
446	TS-PH05-042-0042	P835	28,14	26,81	1,33	positive	40,00*	26,6	13,4	negative
447	TS-PH05-042-0053	P835	29,06	27,56	1,5	positive	40,00*	27,75	12,25	negative
448	TS-PH05-042-0054	P835	28,29	26,97	1,32	positive	40,00*	27,09	12,91	negative
449	TS-PH05-042-0061	P835	30,4	29,36	1,04	positive	40,00*	29,25	10,75	negative
450	TS-PH05-042-0064	P835	28,18	26,58	1,6	positive	40,00*	26,42	13,58	negative
451	TS-PH05-042-0070	P835	28,44	27,27	1,17	positive	40,00*	27,18	12,82	negative
452	TS-PH05-042-0080	P835	29,98	28,67	1,31	positive	40,00*	28,93	11,07	negative
453	TS-PH05-042-0081	P835	27,74	26,61	1,13	positive	40,00*	26,43	13,57	negative
454	TS-PH05-042-0086	P835	28,67	27,26	1,41	positive	40,00*	27,09	12,91	negative
455	TS-PH05-042-0092	P835	29,83	28,56	1,27	positive	40,00*	28,62	11,38	negative
456	TS-PH05-042-0105	P835	27,14	26,85	0,29	positive	40,00*	27,31	12,69	negative
457	TS-PH05-042-0125	P835	26,48	26,3	0,18	positive	40,00*	26,39	13,61	negative
458	TS-PH05-042-0137	P835	27,7	27,74	-0,04	positive	40,00*	27,81	12,19	negative
459	TS-PH05-042-0150	P835	27,32	27,13	0,19	positive	40,00*	27,86	12,14	negative
460	TS-PH05-042-0152	P835	28,45	28,33	0,11	positive	40,00*	28,59	11,41	negative
461	TS-PH05-042-0153	P835	29	28,41	0,6	positive	40,00*	28,64	11,36	negative
462	TS-PH05-042-0157	P835	26,98	26,73	0,25	positive	40,00*	27,25	12,75	negative
463	TS-PH05-042-0161	P835	28,12	27,9	0,22	positive	40,00*	28,7	11,3	negative
464	TS-PH05-042-0184	P835	26,32	26,27	0,05	positive	40,00*	26,41	13,59	negative
465	TS-PH05-042-0202	P835	28,66	28,26	0,4	positive	40,00*	27,88	12,12	negative
466	TS-PH05-042-0207	P835	26,02	25,96	0,06	positive	40,00*	26,29	13,71	negative
467	TS-PH05-042-0219	P835	27,8	27,68	0,12	positive	40,00*	28,19	11,81	negative
468	TS-PH05-042-0283	P835	30,16	28,74	1,42	positive	40,00*	26,99	13,01	negative
469	TS-PH05-043-0001	P835	27,64	26,22	1,42	positive	40,00*	26,29	13,71	negative
470	TS-PH05-043-0008	P835	29,38	28,32	1,06	positive	40,00*	27,76	12,24	negative
471	TS-PH05-043-0015	P835	27,97	27,08	0,89	positive	40,00*	26,78	13,22	negative
472	TS-PH05-043-0021	P835	28,2	27,04	1,16	positive	40,00*	26,71	13,29	negative
473	TS-PH05-043-0029	P835	27,64	27,43	0,21	positive	40,00*	27,83	12,17	negative
474	TS-PH05-043-0034	P835	29,84	28,74	1,1	positive	40,00*	28,36	11,64	negative
475	TS-PH05-043-0055	P835	28,02	27,67	0,35	positive	40,00*	28,19	11,81	negative
476	TS-PH05-043-0067	P835	29,86	28,56	1,3	positive	40,00*	28,24	11,76	negative
477	TS-PH05-043-0068	P835	27,87	27,53	0,34	positive	40,00*	28,32	11,68	negative
478	TS-PH05-043-0070	P835	27,92	27,2	0,72	positive	40,00*	27,13	12,87	negative
479	TS-PH05-043-0076	P835	28,42	28,47	-0,05	positive	40,00*	28,93	11,07	negative
480	TS-PH05-043-0078	P835	26,32	26,16	0,16	positive	40,00*	26,99	13,01	negative
481	TS-PH05-043-0079	P835	26,51	26,79	-0,28	positive	40,00*	26,86	13,14	negative
482	TS-PH05-043-0082	P835	27,45	27,16	0,29	positive	40,00*	27,49	12,51	negative
483	TS-PH05-043-0111	P835	28,18	27,79	0,39	positive	40,00*	27,67	12,33	negative
484	TS-PH05-043-0156	P835	26,42	26	0,42	positive	40,00*	29,84	10,16	negative
485	TS-PH05-044-0009	P880	27,58	27,2	0,38	positive	40,00*	25,39	14,61	negative
486	TS-PH05-044-0020	P880	28,2	27,01	1,18	positive	40,00*	26,88	13,12	negative
487	TS-PH05-044-0039	P880	30,42	28,4	2,02	positive	40,00*	28,74	11,26	negative
488	TS-PH05-045-0078	P880	29,72	27,96	1,76	positive	40,00*	28,11	11,89	negative
489	TS-PH05-046-0001	P880	26,95	25,43	1,51	positive	40,00*	25,47	14,53	negative
490	TS-PH05-046-0002	P880	27,07	26,84	0,23	positive	39,97	25,96	14	negative
491	TS-PH05-046-0011	P880	28,06	28,16	-0,11	positive	37,73	26,57	11,16	negative
492	TS-PH05-046-0014	P880	29,76	28,05	1,71	positive	40,00*	27,81	12,19	negative
493	TS-PH05-046-0018	P880	26,68	26,28	0,4	positive	40,00*	26,71	13,29	negative

494	TS-PH05-046-0019	P880	30,8	29,14	1,66	positive	40,00*	29,06	10,94	negative
495	TS-PH05-046-0033	P880	30,5	28,6	1,9	positive	40,00*	27,91	12,09	negative
496	TS-PH05-057-0006	P880	25,21	24,52	0,69	positive	40,00*	26,35	13,65	negative
497	TS-PH05-057-0015	P880	27,05	25,68	1,37	positive	40,00*	25,71	14,29	negative
498	TS-PH05-062-0043	P880	26,57	25,4	1,17	positive	40,00*	25,64	14,36	negative
499	TS-PH05-063-0002	P880	27,06	26,34	0,72	positive	40,00*	26,76	13,24	negative
500	TS-PH05-063-0016	P880	24,39	23,32	1,07	positive	40,00*	26,02	13,98	negative
501	TS-PH05-064-0024	P880	27,5	26,87	0,63	positive	39,96	25,97	13,99	negative
502	TS-PH05-066-0003	P880	26,61	25,34	1,27	positive	40,00*	26,39	13,61	negative
503	TS-PH05-066-0008	P880	26	24,92	1,08	positive	40,00*	25,9	14,1	negative
504	TS-PH05-073-0011	P880	25,75	24,37	1,38	positive	40,00*	25,15	14,85	negative
505	TS-PH05-073-0012	P880	27,3	25,84	1,46	positive	40,00*	26,19	13,81	negative
506	TS-PH05-074-0034	P880	24,49	22,93	1,56	positive	40,00*	25,64	14,36	negative
507	TS-PH05-074-0038	P880	24,86	23,78	1,08	positive	40,00*	26,22	13,78	negative
508	TS-PH05-074-0045	P880	26,34	24,87	1,47	positive	40,00*	25,7	14,3	negative
509	TS-PH05-074-0054	P880	26,45	25,24	1,21	positive	40,00*	26,01	13,99	negative
510	TS-PH05-074-0058	P880	26,48	25,27	1,21	positive	40,00*	25,73	14,27	negative
511	TS-PH05-075-0005	P880	26,42	25,15	1,27	positive	40,00*	25,96	14,04	negative
512	TS-PH05-075-0025	P880	26,33	25,11	1,22	positive	40,00*	25,58	14,42	negative
513	TS-PH05-075-0036	P880	26,64	25,28	1,36	positive	40,00*	26,08	13,92	negative
514	TS-PH05-076-0036	P880	26,8	25,44	1,36	positive	40,00*	26,41	13,59	negative
515	TS-PH05-079-0014	P880	27,86	26,66	1,2	positive	40,00*	26,99	13,01	negative
516	TS-PH05-080-0014	P880	24,99	23,71	1,28	positive	40,00*	26,27	13,73	negative
517	TS-PH06-001-0017	P698	26,27	25,07	1,2	positive	40,00*	26,14	13,86	negative
518	TS-PH06-001-0039	P698	26,36	25,37	0,99	positive	40,00*	25,88	14,12	negative
519	TS-PH06-001-0048	P698	24,97	23,33	1,64	positive	40,00*	25,83	14,17	negative
520	TS-PH06-001-0050	P698	26,38	25,14	1,24	positive	40,00*	25,55	14,45	negative
521	TS-PH06-001-0064	P698	26,67	25,32	1,35	positive	40,00*	26,31	13,69	negative
522	TS-PH06-001-0067	P698	26,45	25,06	1,39	positive	40,00*	25,8	14,2	negative
523	TS-PH06-001-0069	P698	25,31	24,22	1,09	positive	40,00*	25,42	14,58	negative
524	TS-PH06-001-0071	P698	25,98	24,79	1,19	positive	40,00*	25,51	14,49	negative
525	TS-PH06-001-0072	P698	26,39	25,1	1,29	positive	40,00*	25,4	14,6	negative
526	TS-PH06-003-0007	P698	24,92	23,24	1,68	positive	40,00*	26,34	13,66	negative
527	TS-PH06-004-0001	P698	26,06	24,89	1,17	positive	40,00*	25,83	14,17	negative
528	TS-PH06-004-0005	P698	26,28	25	1,28	positive	40,00*	25,9	14,1	negative
529	TS-PH06-004-0010	P698	26,1	24,84	1,26	positive	40,00*	25,48	14,52	negative
530	TS-PH06-004-0018	P698	27,17	25,93	1,24	positive	40,00*	26,8	13,2	negative
531	TS-PH06-004-0032	P698	26,28	25,14	1,14	positive	40,00*	26,4	13,6	negative
532	TS-PH06-004-0038	P698	26,55	25,25	1,3	positive	40,00*	25,99	14,01	negative
533	TS-PH06-004-0046	P698	26,5	25,06	1,44	positive	40,00*	27,73	12,27	negative
534	TS-PH06-004-0057	P698	28,14	26,84	1,3	positive	40,00*	26,73	13,27	negative
535	TS-PH06-004-0063	P698	25,41	24,17	1,24	positive	40,00*	26,45	13,55	negative
536	TS-PH06-004-0094	P698	25,7	24,51	1,19	positive	40,00*	24,98	15,02	negative
537	TS-PH06-004-0124	P698	27,28	25,91	1,37	positive	40,00*	26,51	13,49	negative
538	TS-PH06-004-0125	P698	27,62	25,96	1,66	positive	40,00*	26,4	13,6	negative
539	TS-PH06-004-0126	P698	26,39	25,13	1,26	positive	40,00*	25,98	14,02	negative
540	TS-PH06-005-0006	P880	25,65	24,49	1,16	positive	40,00*	25,64	14,36	negative
541	TS-PH06-006-0006	P880	26,6	25,16	1,44	positive	40,00*	25,58	14,42	negative
542	TS-PH06-007-0013	P880	26	24,57	1,43	positive	40,00*	24,98	15,02	negative
543	TS-PH06-007-0031	P880	24,34	23,21	1,13	positive	40,00*	25,07	14,93	negative
544	TS-PH06-014-0012	P835	26,43	25,2	1,23	positive	40,00*	25,84	14,16	negative
545	TS-PH06-014-0015	P835	28,54	27,39	1,15	positive	40,00*	27,01	12,99	negative
546	TS-PH06-014-0016	P835	26,96	25,57	1,39	positive	40,00*	25,93	14,07	negative
547	TS-PH06-014-0021	P835	26,65	25,33	1,32	positive	40,00*	25,15	14,85	negative

548	TS-PH06-014-0022	P835	26,29	24,86	1,43	positive	40,00*	24,84	15,16	negative
549	TS-PH06-014-0023	P835	26,08	24,38	1,7	positive	40,00*	26,71	13,29	negative
550	TS-PH06-014-0025	P835	26,84	25,62	1,22	positive	40,00*	26,09	13,91	negative
551	TS-PH06-014-0031	P835	24,42	22,8	1,62	positive	40,00*	25,49	14,51	negative
552	TS-PH06-014-0033	P835	26,98	25,77	1,21	positive	40,00*	26,36	13,64	negative
553	TS-PH06-014-0036	P835	24,21	22,75	1,46	positive	40,00*	25,54	14,46	negative
554	TS-PH06-014-0039	P835	26	24,85	1,15	positive	40,00*	25,3	14,7	negative
555	TS-PH06-014-0061	P835	25,99	24,69	1,3	positive	40,00*	25,34	14,66	negative
556	TS-PH06-014-0062	P835	26,54	25,28	1,26	positive	40,00*	25,33	14,67	negative
557	TS-PH06-014-0068	P835	25,71	24,41	1,3	positive	40,00*	25,48	14,52	negative
558	TS-PH06-014-0083	P835	27,01	25,95	1,06	positive	40,00*	26,26	13,74	negative
559	TS-PH06-014-0084	P835	26,56	25,36	1,2	positive	40,00*	25,86	14,14	negative
560	TS-PH06-014-0085	P835	26,71	25,48	1,23	positive	40,00*	26,16	13,84	negative
561	TS-PH06-014-0086	P835	26,87	25,54	1,33	positive	40,00*	26,25	13,75	negative
562	TS-PH06-014-0087	P835	27,09	25,59	1,5	positive	40,00*	26,14	13,86	negative
563	TS-PH06-014-0093	P835	25,58	24,36	1,22	positive	40,00*	25,4	14,6	negative
564	TS-PH06-014-0111	P835	27,43	26,3	1,13	positive	40,00*	26,97	13,03	negative
565	TS-PH06-014-0118	P835	25,71	24,48	1,23	positive	40,00*	26,21	13,79	negative
566	TS-PH06-014-0120	P835	25,73	24,3	1,43	positive	40,00*	25,3	14,7	negative
567	TS-PH06-014-0126	P835	25,64	24,12	1,52	positive	40,00*	24,98	15,02	negative
568	TS-PH06-014-0127	P835	25,1	23,94	1,16	positive	40,00*	25,2	14,8	negative
569	TS-PH06-014-0130	P835	28,35	26,97	1,38	positive	40,00*	27,21	12,79	negative
570	TS-PH06-014-0132	P835	26,47	25,21	1,26	positive	40,00*	26,12	13,88	negative
571	TS-PH06-014-0137	P835	26,55	25,08	1,47	positive	40,00*	27,93	12,07	negative
572	TS-PH06-014-0150	P835	26,76	25,31	1,45	positive	40,00*	25,29	14,71	negative
573	TS-PH06-014-0155	P835	25,74	24,37	1,37	positive	40,00*	25,85	14,15	negative
574	TS-PH06-014-0160	P835	25,93	24,51	1,42	positive	40,00*	32,57	7,43	negative
575	TS-PH06-014-0161	P835	26,76	25,52	1,24	positive	40,00*	26,19	13,81	negative
576	TS-PH06-014-0166	P835	26,52	25,13	1,39	positive	40,00*	26,38	13,62	negative
577	TS-PH06-014-0170	P835	25,94	24,66	1,28	positive	40,00*	24,96	15,04	negative
578	TS-PH06-022-0007	P880	26,37	25,09	1,28	positive	40,00*	25,67	14,33	negative
579	TS-PH06-022-0062	P880	27,42	26,05	1,37	positive	40,00*	26,3	13,7	negative
580	TS-PH06-023-0018	P880	25,61	24,41	1,2	positive	40,00*	25,75	14,25	negative
581	TS-PH06-031-0011	P880	26,36	25,47	0,89	positive	40,00*	25,73	14,27	negative
582	TS-PH06-031-0018	P880	27,12	25,91	1,21	positive	40,00*	26,64	13,36	negative
583	TS-PH06-032-0007	P880	27,91	26,66	1,25	positive	40,00*	26,66	13,34	negative
584	TS-PH06-035-0014	P880	26,64	25,28	1,36	positive	40,00*	26,38	13,62	negative
585	TS-PH06-035-0018	P880	26,15	24,88	1,27	positive	40,00*	26,47	13,53	negative
586	TS-PH06-035-0028	P880	24,91	24,01	0,9	positive	40,00*	26,97	13,03	negative
587	TS-PH06-035-0032	P880	26,16	24,85	1,31	positive	40,00*	26,5	13,5	negative
588	TS-PH06-041-0003	P880	26,93	25,6	1,33	positive	40,00*	26,01	13,99	negative
589	TS-PH06-041-0006	P880	26,95	25,61	1,34	positive	40,00*	26,62	13,38	negative
590	TS-PH06-044-0003	P880	25,9	24,87	1,03	positive	40,00*	25,35	14,65	negative
591	TS-PH06-044-0037	P880	27,04	25,6	1,44	positive	40,00*	26,3	13,7	negative
592	TS-PH06-046-0013	P880	26,99	25,63	1,36	positive	40,00*	25,76	14,24	negative
593	TS-PH06-046-0020	P880	26,09	25	1,09	positive	40,00*	25,77	14,23	negative
594	TS-PH06-046-0036	P880	25,96	24,76	1,2	positive	40,00*	27,18	12,82	negative
595	TS-PH06-046-0056	P880	26,89	25,58	1,31	positive	40,00*	25,54	14,46	negative
596	TS-PH06-046-0069	P880	26,02	24,85	1,17	positive	40,00*	25,73	14,27	negative
597	TS-PH06-046-0074	P880	40,00*	25,42	14,58	(partial copy)#	40,00*	26,19	13,81	negative
598	TS-PH06-046-0083	P880	26,12	25,02	1,1	positive	40,00*	26,95	13,05	negative
599	TS-PH06-047-0007	P880	26,14	24,93	1,21	positive	40,00*	25,4	14,6	negative
600	TS-PH06-047-0040	P880	26,32	24,96	1,36	positive	40,00*	26,08	13,92	negative

601	TS-PH06-047-0114	P880	26,62	25,21	1,41	positive	40,00*	26,17	13,83	negative
602	TS-PH06-048-0011	P835	26,7	25,47	1,23	positive	40,00*	25,3	14,7	negative
603	TS-PH06-048-0018	P835	26,38	25,12	1,26	positive	40,00*	25,78	14,22	negative
604	TS-PH06-048-0064	P835	26,64	25,19	1,45	positive	40,00*	25,53	14,47	negative
605	TS-PH06-049-0052	P835	27,39	26,17	1,22	positive	40,00*	26,32	13,68	negative
606	TS-PH06-050-0003	P835	27,89	26,54	1,35	positive	40,00*	27,19	12,81	negative
607	TS-PH06-050-0014	P835	26,47	25	1,47	positive	40,00*	26	14	negative
608	TS-PH06-050-0026	P835	26,1	24,87	1,23	positive	40,00*	26,02	13,98	negative
609	TS-PH06-050-0027	P835	26,6	25,47	1,13	positive	40,00*	25,92	14,08	negative
610	TS-PH06-050-0028	P835	26,45	25,21	1,24	positive	40,00*	25,01	14,99	negative
611	TS-PH06-050-0030	P835	26,96	25,73	1,23	positive	40,00*	26,13	13,87	negative
612	TS-PH06-050-0033	P835	28,07	26,71	1,36	positive	40,00*	26,55	13,45	negative
613	TS-PH06-050-0040	P835	27,63	25,89	1,74	positive	40,00*	25,77	14,23	negative
614	TS-PH06-050-0043	P835	26,44	24,9	1,54	positive	40,00*	25,56	14,44	negative
615	TS-PH06-050-0059	P835	26,68	25,29	1,39	positive	40,00*	25,69	14,31	negative
616	TS-PH06-050-0067	P835	28,55	26,86	1,69	positive	40,00*	25,25	14,75	negative
617	TS-PH06-050-0095	P835	27,3	25,85	1,45	positive	40,00*	25,02	14,98	negative
618	TS-PH06-052-0004	P835	27,22	25,87	1,35	positive	40,00*	25,96	14,04	negative
619	TS-PH06-052-0029	P835	27,78	26,28	1,5	positive	40,00*	26,45	13,55	negative
620	TS-PH06-053-0011	P835	28,14	26,71	1,43	positive	40,00*	26,79	13,21	negative
	neg ctrl, P698		40,00*	30,02	9,98	negative	38,98	27,99	11,00	negative
	neg ctrl, P698		40,00*	27,79	12,21	negative	35,23	25,26	9,97	negative
	neg ctrl, P698		40,00*	25,21	14,79	negative	40,00*	25,88	14,12	negative
	neg ctrl, P698		40,00*	24,69	15,31	negative	40,00*	24,38	15,62	negative
	neg ctrl, P698		40,00*	25,92	14,08	negative	40,00*	26,26	13,74	negative
	neg ctrl, P835		35,69	26,69	9,00	negative	38,88	30,65	8,23	negative
	neg ctrl, P835		40,00*	25,46	14,54	negative	40,00*	27,13	12,87	negative
	neg ctrl, P835		40,00*	25,10	14,90	negative	40,00*	25,76	14,24	negative
	neg ctrl, P835		40,00*	26,04	13,96	negative	40,00*	26,81	13,19	negative
	neg ctrl, P835		40,00*	24,40	15,60	negative	40,00*	24,88	15,12	negative
	neg ctrl, P880		40,00*	27,36	12,64	negative	40,00*	26,25	13,75	negative
	neg ctrl, P880		40,00*	26,66	13,34	negative	40,00*	27,26	12,74	negative
	neg ctrl, P880		40,00*	25,22	14,78	negative	40,00*	26,18	13,82	negative
	neg ctrl, P880		39,95	25,11	14,84	negative	38,30	25,11	13,18	negative
	neg ctrl, P880		40,00*	25,04	14,96	negative	40,00*	24,82	15,18	negative
	ctrl with backbone						28,61	28,52	0,09	positive
	ctrl with backbone						26,61	25,81	0,81	positive
	ctrl with backbone						26,36	25,69	0,67	positive
	ctrl with backbone						26,99	25,60	1,39	positive
	ctrl with backbone						26,47	25,93	0,54	positive
	ctrl with backbone						28,25	29,09	-0,85	positive
	ctrl with backbone						28,07	28,28	-0,21	positive
	ctrl with backbone						27,32	25,98	1,35	positive
	ctrl with backbone						28,69	28,22	0,47	positive
	ctrl with backbone						29,22	28,96	0,25	positive
	ctrl with backbone						30,32	28,19	2,13	positive
	ctrl with backbone						29,21	28,48	0,73	positive
	ctrl with backbone						30,13	28,53	1,59	positive
	ctrl with backbone						29,19	28,89	0,30	positive
	ctrl with backbone						28,58	28,40	0,18	positive
# portant seulement une partie de la copie du gène ahas mais positive pour blb1 et blb2							* Aucun signal détecté après 40 cycles			

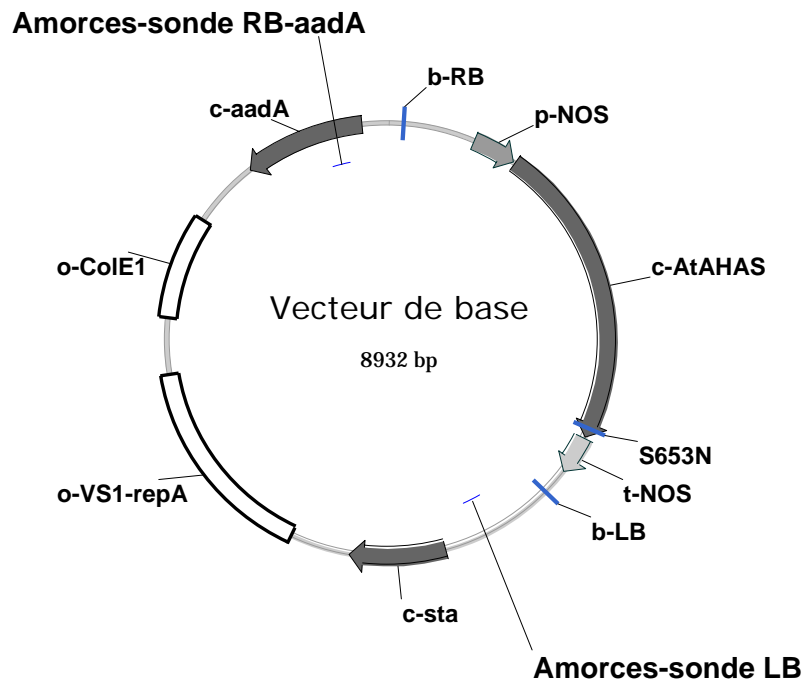
Le diagramme de plasmide ci-dessous (*Figure 1*) montre l'emplacement, sur le squelette du vecteur de base utilisé pour la préparation des constructions génétiques VCPMA16 et VCPMA19, des ensembles d'amorces-sondes RB-aadA et LB.

L'ensemble amorces-sonde RB-aadA est situé à environ 300 paires de base de la limite droite (RB) et se trouve entièrement à l'intérieur du gène *aadA*. La taille de l'amplicon est de 137 pb.

L'ensemble amorces-sonde LB (limite gauche) est situé à environ 400 pb de la LB et a une taille d'amplicon de 103 pb.

L'ensemble amorces-sonde du gène témoin endogène est situé sur le génome de la pomme de terre, à l'intérieur d'un gène endogène à faible nombre de copies. La taille de l'amplicon est de 94 pb.

**Figure 1.**

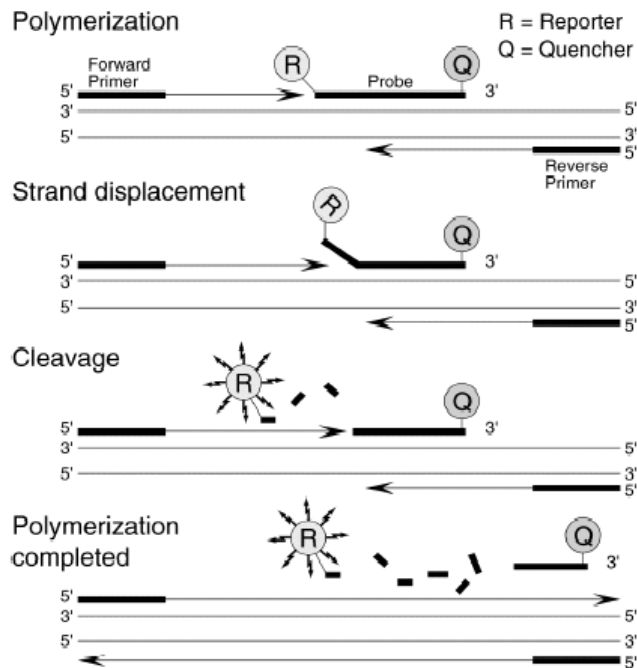


Le gène de la résistance à la spectinomycine présente une homologie séquentielle avec les numéros d'accèsion AAX97761 (protéine) et AY995143 (nucléotide, première région codante).

L'analyse PCR en temps réel est une méthode PCR quantitative hautement sensible. Une sonde visant une séquence située entre les deux amorces est ajoutée à celles-ci. Cette sonde est marquée à l'aide d'un gène rapporteur (fluorophore) et de son inhibiteur (quencher) (voir Figure 2 ci-dessous). Lors de la séparation des brins d'ADN, la sonde se disjoint et le fluorophore et son quencher sont séparés, induisant la fluorescence. Les produits d'amplification du processus de PCR sont mesurés

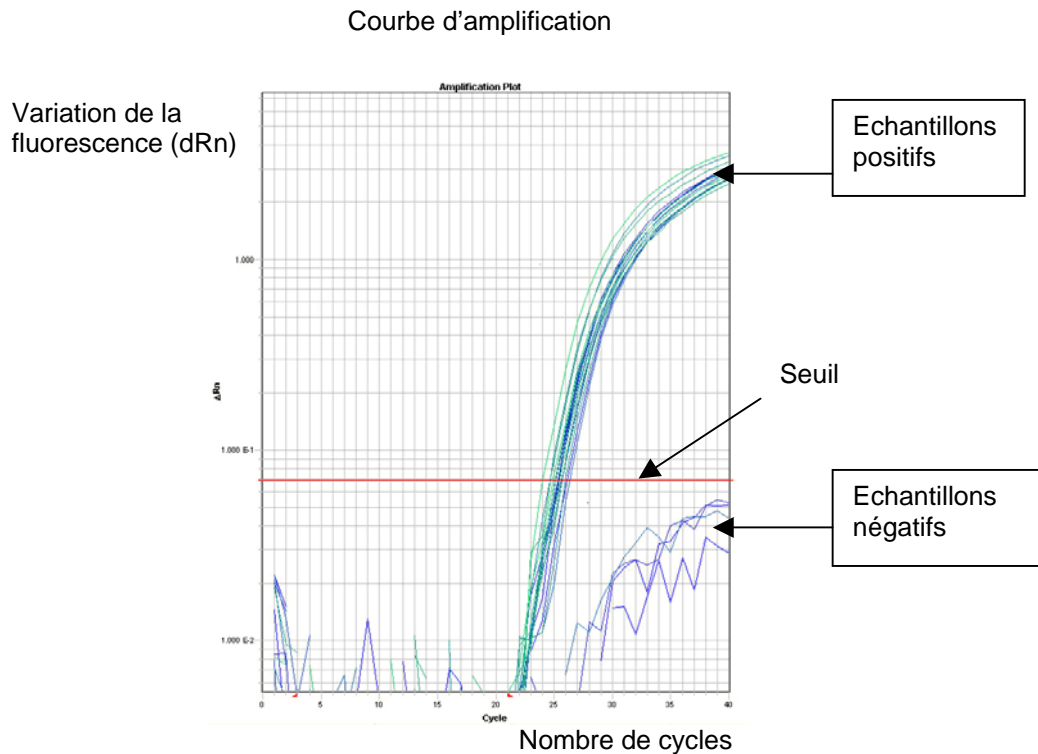


quantitativement par la fluorescence observée durant ce processus. Les données de la PCR en temps réel s'expriment en valeurs Ct, qui mesurent le nombre de cycles PCR à partir duquel les résultats du processus se distinguent du bruit de fond. Le nombre de cycles PCR utilisés dans nos analyses est limité à 40.

**Figure 2.**

*Polymerization: Polymérisation*  
*Forward primer: amorce sens*  
*Reverse primer: amorce anti-sens*  
*Probe: sonde*  
*Reporter: rapporteur*  
*Quencher: quencher*  
*Strand displacement: déplacement des brins d'ADN*  
*Cleavage: clivage*  
*Polymerization completed : Polymérisation terminée*

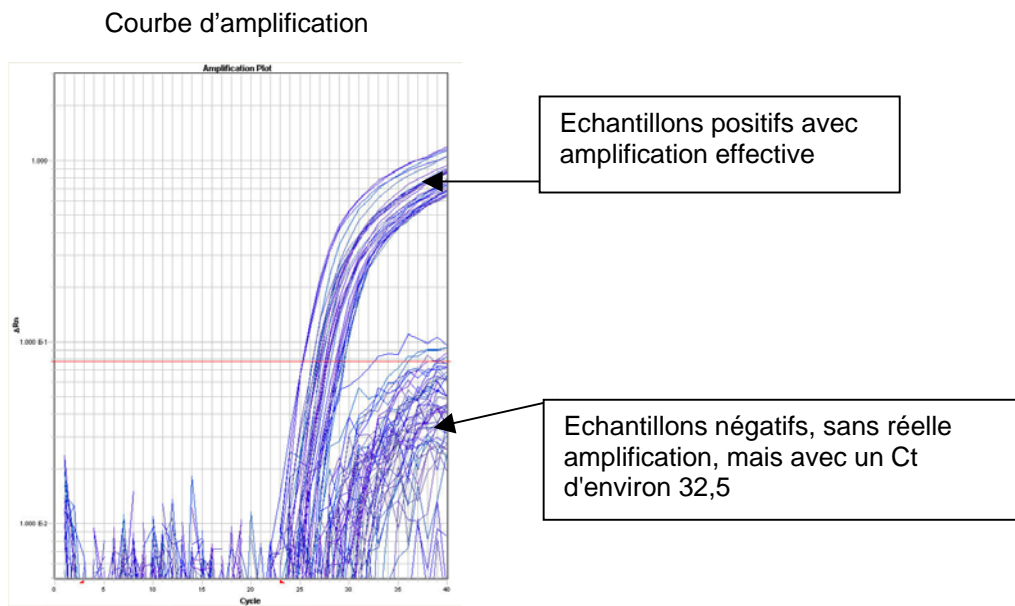
La PCR en temps réel permet de suivre l'amplification cycle par cycle. Nos analyses font appel au procédé à la nucléase fluorogénique 5' utilisé par les sondes Taqman, comportant l'émission de fluorescence par la sonde et la mesure au fluorimètre de cette fluorescence, proportionnelle au produit de l'amplification. La variation de fluorescence est affichée sous forme de graphe par l'instrument (ABI Prism 7900HT). La quantification de cette observation fait appel à la détermination d'une ligne de seuil, la valeur de Ct étant définie comme le "nombre fractionnel exprimant la quantité de cycles à partir de laquelle le niveau d'amplification de la séquence cible atteint un seuil prédéterminé" (User Bulletin #2:ABI PRISM 7700 sequence Detection System", Applied Biosystems).

**Figure 3. Courbe d'amplification**

Lors de l'analyse de présence/absence du gène *aadA*, tous les échantillons sont analysés à l'aide de réactions doubles, comportant un ensemble amorces-sonde pour le gène témoin endogène en plus de celui pour le RB-*aadA*. Le gène témoin endogène permet de vérifier que la qualité et la quantité d'ADN dans l'échantillon, ainsi que les paramètres de la réaction, sont satisfaisants. La comparaison entre la valeur Ct de l'ensemble amorces-sonde RB-*aadA* et celle de l'ensemble du témoin endogène donne la valeur dCt ( $dCT = CT_X - CT_R$ , soit la différence entre les nombres de cycles nécessaires à l'amplification cible et à l'amplification témoin pour arriver au seuil de détection). Cette valeur est utilisée pour le calcul du nombre de copies mais aussi pour la détection de RB-*aadA*, et permet de distinguer entre les insertions effectives et les faux positifs dus à des contaminations ou autres raisons similaires. Toutes les lames analysées comportent des échantillons témoins positifs (lignées de pommes de terre dont on sait qu'elles contiennent des séquences du squelette du vecteur) et témoins négatifs. Ces derniers peuvent consister en lignées non transgéniques ou en témoins dépourvus d'ADN matriciel.

Il peut arriver que la courbe d'amplification atteigne tout juste le seuil, donnant une valeur Ct anormalement basse, sans qu'une amplification réelle ait effectivement eu lieu. Ce phénomène peut être observé sur le graphe original de l'amplification (Voir Figure 4 ci-dessous). Sa fréquence varie selon le type de test (combinaisons d'ensembles amorces-sonde), l'origine des oligonucléotides et la qualité des extractions.

**Figure 4. Courbe d'amplification**



### 3. Détection des lignées transgéniques (gène *ahas*)

#### Extraction de l'ADN

L'ADN génomique est isolé à partir de tissu foliaire frais en utilisant Nucleon PhytoPure (Amersham Biosciences).

#### Méthode de PCR

##### Protocole de démarrage de la réaction de PCR

4 µl ADN  
2 µl tampon de réaction PCR Red Taq 10X (Sigma)  
1 µl polymérase ADN Red Taq (Sigma)  
0,4 µl amorce sens (25 µM)  
0,4 µl amorce anti-sens (25 µM)  
0,4 µl dNTP (10 µM) (Sigma)  
11,8 µl H<sub>2</sub>O

##### Paire d'amorces pour détection d'AHAS

AHAS1 frw 5' - AAC AAC AAC ATC TTC TTC GAT C- 3'

AHAS1 rev 5'TAA CGA GAT TTG TAG CTC CG- 3'

##### Programme de PCR pour détection d'AHAS

1. 94 °C 1,5 min

2. 94 °C 30 s

3. 55 °C 30 s

4. 72 °C 1 min

5. 72 °C 7 min

Etapes 2-4 répétées sur 32 cycles.

Taille de l'amplicon : 509 pb.

**ANNEXE 2**

**Disposition proposée pour la parcelle d'essais**

4401	4402	4403	4404	4405	4406	4407	4408	4409	4410	4411	4412	4413	4414	4415	4416
3301	3302	3303	3304	3305	3306	3307	3308	3309	3310	3311	3312	3313	3314	3315	3316
2201	2202	2203	2204	2205	2206	2207	2208	2209	2210	2211	2212	2213	2214	2215	2216
1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116

**ANNEXE 3 (information confidentielle)**