



**HAL**  
open science

## **Avis sur les nouvelles techniques d'obtention de plantes (New plant breeding techniques-NPBT)**

Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny,  
Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno B. Chauvel, Cécile Collonnier, Denis  
Couvret, Elie Dassa, et al.

### ► **To cite this version:**

Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Pascal Boireau, et al.. Avis sur les nouvelles techniques d'obtention de plantes (New plant breeding techniques-NPBT). [0] Haut Conseil de Biotechnologie. 2017. hal-02791518

**HAL Id: hal-02791518**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02791518>**

Submitted on 5 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

**COMITE SCIENTIFIQUE**  
**AVIS SUR LES NOUVELLES TECHNIQUES**  
**D'OBTENTION DE PLANTES (*NEW PLANT***  
***BREEDING TECHNIQUES-NPBT*)**

Paris le 2 novembre 2017  
*(adopté par le CS le 26 avril 2017)*

---



## Table des matières

<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>3</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>15</b>
1.1. CONTEXTE .....	15
1.2. METHODE DE TRAVAIL .....	16
1.3. ÉTAT DE L'ART ET QUESTIONS SUR LE POINT DE LA VARIATION NATURELLE ET DES MUTATIONS .....	16
1.3.1. CARACTERISATION GENERALE DES NPBT .....	18
1.3.2. QUESTIONS SOULEVEES PAR LES NPBT .....	20
1.4. CONSIDERATIONS SUR LA VARIATION GENETIQUE NATURELLE AU SEIN D'UNE ESPECE VEGETALE .....	21
1.4.1. L'ORIGINE DES VARIATIONS GENETIQUES.....	21
1.4.2. LE DEVENIR DES VARIATIONS GENETIQUES : L'ÉVOLUTION NATURELLE (SANS INTERVENTION VOLONTAIRE DE L'HOMME).....	23
1.4.3. HETEROGENEITE DE LA VARIATION AU SEIN DES GENOMES.....	23
1.4.4. LA VARIATION INTRA- ET INTERSPECIFIQUE .....	24
1.4.5. SELECTION PAR L'HOMME ET ÉVOLUTION DES ESPÈCES CULTIVÉES .....	24
1.4.6. MUTATIONS CIBLÉES, HORS CIBLES ET VARIATION NATURELLE .....	25
<b>2. DEFINITION DES TERMES ET TECHNIQUES.....</b>	<b>26</b>
2.1. MULTIPLEXAGE ET OBTENTION SIMULTANÉE DE PLUSIEURS MODIFICATIONS SPÉCIFIQUES DE SITES.....	26
2.2. LIMITES ENTRE SDN1, 2 ET 3 .....	27
2.3. CONSIDERATIONS SUR L'INTRODUCTION DES EFFECTEURS DANS LA CELLULE CIBLE ET SUR LA VECTORISATION .....	27
2.3.1. TRANSFORMATION PAR LA BACTÉRIE AGROBACTERIUM TUMEFACIENS .....	28
2.3.2. TRANSFORMATION DIRECTE .....	28
2.4. MÉTHODES DE SÉLECTION DES CELLULES ET PLANTES MODIFIÉES ET DE SUPPRESSION DES TRANSGÈNES DE SÉLECTION .....	29
2.5. RÉGÉNÉRATION D'UNE PLANTE ENTIÈRE.....	29
2.6. TRANSFORMATION TRANSITOIRE OU STABLE DES PLANTES.....	30
2.6.1. SDN .....	30
2.6.2. RdDM .....	31
2.7. RELATION ENTRE LES MODIFICATIONS DES SÉQUENCES D'ADN ET LE PHÉNOTYPE .....	31
<b>3. LES MÉTHODES D'ANALYSE ET DE TRAÇABILITÉ DES PRODUITS ET PLANTES ISSUS DES TECHNIQUES ÉTUDIÉES (POINT N°1 DE LA SAISINE) .....</b>	<b>32</b>
3.1. CONTEXTUALISATION.....	32
3.1.1. LE CONTEXTE RÉGLEMENTAIRE.....	32
3.1.2. DÉFINITIONS.....	33
3.1.3. DÉMARCHE SUIVIE PAR LE CS .....	34
3.2. DÉTECTION DES PLANTES ET PRODUITS ISSUS D'OGM .....	35

3.3.	DETECTION DE LA TECHNIQUE DE VECTORISATION.....	37
3.3.1.	AGROBACTERIES.....	37
3.3.2.	TRANSFORMATION DIRECTE (TRANSFORMATION DE PROTOPLASTES, BIOLISTIQUE ETC.).....	38
3.3.3.	VIRUS.....	38
3.4.	DETECTION DES EFFECTEURS .....	39
3.5.	SYNTHESE SUR LA DETECTION DES PLANTES ET PRODUITS ISSUS DES NPBT .....	39
3.5.1.	UN DOCUMENT D'ACCOMPAGNEMENT FAVORISANT LA DETECTION, L'IDENTIFICATION ET LA TRAÇABILITE DES NPBT.....	39
3.5.2.	TABLEAUX RECAPITULATIFS .....	39
3.5.3.	CONCLUSIONS.....	43

#### **4. LES ENJEUX POUR LA COEXISTENCE DES FILIERES (POINT N°2 DE LA SAISINE EN LIEN AVEC LE POINT PRECEDENT) ..... 44**

4.1.	PRODUIT FINAL VERSUS MODALITE D'OBTENTION DES PLANTES .....	44
4.2.	CAS OU LA DIRECTIVE 2001/18/CE SERAIT INTERPRETEE COMME EXCLUANT DE SON CHAMP D'APPLICATION LES PLANTES ISSUES DE CERTAINES NPBT .....	45
4.3.	CAS OU LA DIRECTIVE 2001/18/CE SERAIT INTERPRETEE COMME INCLUANT DANS SON CHAMP D'APPLICATION LES PLANTES ISSUES DE CERTAINES NPBT .....	45

#### **5. LES RISQUES DIRECTS POUR LA SANTE ET L'ENVIRONNEMENT LIES AUX CARACTERISTIQUES NOUVELLES DES PRODUITS OBTENUS (POINT N°3 DE LA SAISINE)..... 46**

5.1.	LES RISQUES DECOULANT DES CARACTERES RECHERCHES .....	48
5.1.1.	RISQUES LIES A LA MODIFICATION DE PLANTES CULTIVEES NON PRECEDEMMENT GENETIQUEMENT MODIFIEES.....	49
5.1.2.	RISQUES LIES A D'EVENTUELS CARACTERES NOUVEAUX .....	49
5.1.2.1.	CARACTERES NOUVEAUX DANS L'ESPECE.....	49
5.1.2.2.	CARACTERE NOUVEAU (BIOLOGIE DE SYNTHESE) .....	50
5.2.	RISQUES DUS AUX EFFETS NON INTENTIONNELS INHERENTS AUX NOUVELLES TECHNIQUES.....	51
5.2.1.	EFFETS INDESIRABLES LIES A LA PERSISTANCE DE L'EFFECTEUR .....	51
5.2.2.	RISQUES LIES AUX MODIFICATIONS NON INTENTIONNELLES DU GENOME, MODIFICATIONS HORS-CIBLES.....	52
5.2.3.	RISQUES LIES A L'ASSOCIATION DE MODIFICATIONS CIBLEES .....	54
5.3.	LES RISQUES LIES A L'ACCELERATION POTENTIELLE DE LA CREATION VARIETALE DECOULANT DE LA FACILITE DE MISE EN ŒUVRE TECHNIQUE DES NPBT ET DE LEUR EFFICACITE .....	55

#### **6. MESURES DE GESTION A METTRE EN PLACE POUR PREVENIR ET LIMITER LES RISQUES POUR LA SANTE ET L'ENVIRONNEMENT LIES A L'UTILISATION DE PRODUITS ISSUS DE CES NOUVELLES TECHNIQUES, SI DE TELS RISQUES SONT MIS EN EVIDENCE (POINT N°4 DE LA SAISINE, EN LIEN AVEC LE POINT 3)..... 56**

#### **7. PROPOSITION DE PISTES INTERMEDIAIRES ENTRE LES DISPOSITIONS DU CATALOGUE EUROPEEN ET CELLES DE LA DIRECTIVE 2001/18/CE, QUI VOUS PARAITRAIENT UTILES POUR ENCADRER L'USAGE DE CES NOUVELLES TECHNIQUES SUR LE TERRITOIRE EUROPEEN, INTEGRANT VOTRE ANALYSE**

<b>DES ENJEUX SOCIO-ECONOMIQUES (EN LIEN AVEC LE POINT 7 DE LA SAISINE) .....</b>	<b>57</b>
7.1. RAPPEL DES DEUX DISPOSITIFS CONSIDERES .....	57
7.1.1. INSCRIPTION AU CATALOGUE FRANÇAIS .....	57
7.1.2. DISPOSITIF EUROPEEN SPECIFIQUE AUX PLANTES OGM .....	58
7.2. REFLEXION SUR UN DISPOSITIF INTERMEDIAIRE .....	58
7.2.1. NOTION DE DIFFERENCE/EQUIVALENCE EN DEHORS DU CARACTERE APORTE .....	58
7.2.2. MODALITES : UN DISPOSITIF ASSIS SUR UNE APPRECIATION AU CAS PAR CAS DE LA NECESSITE D'UNE EVALUATION SPECIFIQUE.....	58
7.3. METHODES D'EVALUATION PROPOSEES .....	61
<b>BIBLIOGRAPHIE : .....</b>	<b>63</b>
<b>ANNEXE I SAISINE.....</b>	<b>70</b>
<b>ANNEXE II LETTRE DE CADRAGE.....</b>	<b>72</b>
<b>ANNEXE III LISTE DES MEMBRES DU GROUPE DE TRAVAIL.....</b>	<b>76</b>
<b>ANNEXE IV LISTE DES MEMBRES DU COMITE SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>77</b>
<b>ANNEXE V RISQUES NON SPECIFIQUES ET/OU INDIRECTS.....</b>	<b>80</b>
<b>ANNEXE VI GLOSSAIRE .....</b>	<b>88</b>



## Résumé

Le sigle NPBT<sup>1</sup> désigne un ensemble hétérogène de techniques utilisables dans le cadre de l'obtention de variétés végétales. Une question centrale, aujourd'hui débattue dans l'Union Européenne, concerne le cadre réglementaire d'utilisation de ces techniques. Dans ce contexte se posent de multiples questions relatives à l'évaluation sanitaire et environnementale des plantes issues de NPBT, mais aussi à leur détection, leur traçabilité, et leur éventuel étiquetage.

Le Comité Scientifique (CS) du HCB a rédigé le présent avis en s'appuyant sur le rapport d'un groupe de travail<sup>2</sup> et sur les discussions menées lors de quatre séances plénières<sup>3</sup>. Le CS avait pour mandat<sup>4</sup> en réponse à une saisine des ministres en charges de l'Environnement et de l'Agriculture de se prononcer sur :

- les méthodes d'analyse et de **traçabilité** des plantes et des produits issus des NPBT ;
- en lien avec le point précédent, les enjeux pour la coexistence des filières ;
- les risques **directs** pour la santé et l'environnement liés aux **caractéristiques nouvelles** des plantes et des produits obtenus<sup>5</sup> ;
- les **mesures de gestion** à mettre en place pour prévenir et limiter les risques pour la santé et l'environnement liés à l'utilisation des plantes et des produits issus de ces nouvelles techniques, si de tels risques étaient mis en évidence ;
- des propositions de **pistes intermédiaires** entre les dispositions du Catalogue européen et celles de la Directive 2001/18/CE, qui paraîtraient utiles pour encadrer l'usage de ces nouvelles techniques sur le territoire européen.

### ***Périmètre de l'avis***

Le CS du HCB a pris en compte, dans son avis, l'ensemble des techniques aujourd'hui discutées au niveau européen<sup>6</sup>. Il a également traité de techniques connexes comme les nucléases TALEN<sup>7</sup> et les nucléases CRISPR-Cas9<sup>8</sup> et a aussi élargi son propos à l'ensemble des utilisations des ségrégants

---

<sup>1</sup> *New Plant Breeding Techniques* (nouvelles techniques d'obtention de plantes).

<sup>2</sup> Voir Annexe III.

<sup>3</sup> Pour faciliter la lecture le CS a défini certains termes utilisés dans le document : glossaire présent en Annexe VI.

<sup>4</sup> Par décision du Bureau du HCB voir Annexe II.

<sup>5</sup> Ainsi, la saisine n'interroge le HCB que sur les risques *directs* et *spécifiques* liés aux NPBT et aux caractères qu'elles permettent de mettre en œuvre. Les risques liés à des caractéristiques partagées avec des plantes issues de transgénèse, de mutagenèse aléatoire ou de méthodes d'obtention traditionnelles sont décrits dans l'annexe V de l'avis du CS.

<sup>6</sup> La mutagenèse dirigée par oligonucléotides (ODM), les nucléases à doigt de zinc (ZFN), la cisgénèse, l'intragenèse, la greffe entre plantes GM et non GM, l'agroinfiltration, les modifications épigénétiques par RNA-dependent DNA methylation (RdDM) et le Reverse Breeding (liste de techniques identifiées par les Pays-Bas en 2006) (voir [fiches techniques](#)).

<sup>7</sup> *Transcription Activator-like Effector Nuclease*.

<sup>8</sup> *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats associated protein 9*.

négatifs, à l'interférence ARN ainsi qu'au multiplexage rendu possible par certaines de ces techniques. L'avis concerne l'utilisation de ces techniques sur des plantes d'intérêt agronomique.

### ***Préambule à l'avis***

Dans un préambule à l'avis, le CS a abordé la question de la variation génétique naturelle au sein d'une espèce végétale cultivée. Le CS y décrit aussi le type de mutations que l'on pourrait obtenir, en particulier par les techniques de nucléases dirigées (*site-directed nucleases*, SDN). Ce point est crucial pour caractériser les mutations que l'on peut obtenir par certaines NPBT, notamment les nucléases dirigées (*site-directed nucleases*, SDN), pour les comparer aux mutations naturelles et pour considérer les questions de détection, de traçabilité, d'évaluation et de gestion des risques des variétés qui en sont issues.

Le CS rappelle que les mutations obtenues par les techniques SDN sont caractérisées par leur ciblage dans le génome. Le CS note dans son avis que certaines techniques de mutagenèse ciblée peuvent être associées à des mutations non désirées (hors-cible), tout comme celles associées aux techniques de mutagenèse conventionnelles ou qui apparaissent naturellement, mutations qui pourraient modifier des séquences du génome encore mal caractérisées sur le plan fonctionnel.

L'avis considère les questions listées ci-dessus.

### ***Les méthodes d'analyse et de traçabilité des produits et plantes issus des techniques étudiées***

Une première question vise à déterminer si les produits issus des NPBT peuvent être distingués des produits issus des approches conventionnelles de sélection des plantes cultivées.

Si les pouvoirs publics souhaitent mettre en place une traçabilité moléculaire et des règles de coexistence pour les produits issus des NPBT<sup>9</sup>, la mise en œuvre de ces dispositifs dépendrait en effet étroitement de la question de la distinguabilité. Or, pour certaines de ces techniques, les modifications obtenues sont techniquement très difficiles à mettre en évidence.

Le CS a identifié trois points à prendre en compte pour la traçabilité des plantes issues des différentes NPBT :

- la détectabilité d'une caractéristique moléculaire à l'échelle de l'ADN (mutation(s) : insertion, délétion, substitution...),
- l'identification de la technique à l'origine de la caractéristique moléculaire : si une modification moléculaire de l'ADN est identifiée, peut-on remonter à la technique utilisée ?

---

<sup>9</sup> Sur le même principe que pour les plantes génétiquement modifiées (PGM).

- l'analyse pratique en conditions de routine en production agro-industrielle : considérant les outils d'analyse disponibles, quelles seraient les limites en termes de détection et d'identification ?

Par ailleurs, l'existence de la variation naturelle et de mutations fortuites, apparaissant naturellement (voir le préambule), peut compliquer le point de savoir si c'est bien une NPBT qui a été utilisée pour sélectionner la plante cultivée.

Les éléments d'analyse ayant nourri le débat et fait l'objet de discussions au CS sont les suivants :

- En l'absence d'information sur la modification, le CS rappelle que, à la différence des plantes transgéniques pour lesquelles des outils moléculaires permettent de détecter certains transgènes, il sera impossible de détecter la modification de certains produits issus de NPBT. Le CS cite par exemple les produits issus de SDN1, SDN2, ODM, rares SDN3<sup>10</sup>, RdDM, produits issus de scion greffé sur plantes GM, ségréants négatifs.
- De plus, comme dans le cas de plantes transgéniques, lorsque la détection de plantes issues de NPBT sera possible, que ce soit dans des produits finis ou lors des étapes de production, le CS note que, selon la complexité des mélanges, les biais d'échantillonnage associés à la limite technique de détection auront un impact sur la possibilité de détecter certaines modifications.
- Si la modification moléculaire est détectable, et éventuellement quantifiable, si l'on connaît la séquence ou le gène modifié, la technique originelle mise en œuvre pour générer la modification sera toutefois très difficile à identifier sur la seule base de l'étude de l'ADN du produit. Une déclaration par le producteur, de la technique utilisée, avec mise à disposition des méthodes d'identification de la modification, comme c'est la règle pour les plantes transgéniques, permettrait de pallier cette lacune.
- Cependant, même en disposant de ces informations, la détection pourrait s'avérer impossible dans les cas suivants : certains cas de greffe ; pour les ségréants négatifs<sup>11</sup> ; pour les filières de transformation où des mélanges de produits sont utilisés.
- Enfin, pour certaines NPBT, des effecteurs<sup>12</sup> sont utilisés lors des phases de génération de la plante en milieu confiné. La persistance de fragments d'ADN des effecteurs peut engendrer des plantes qui seraient alors transgéniques. Le CS observe que ces plantes transgéniques, facilement identifiables et traçables grâce à leur transgène, seront soumises aux exigences relatives aux OGM, en milieu confiné, puis selon la directive 2001/18 si ces effecteurs sont conservés dans les plantes ou produits de plantes mis sur le marché. Le CS choisit donc de focaliser son analyse sur les plantes exemptes d'effecteurs qui seraient mises sur le marché.

Ainsi :

- Pour les techniques générant une modification génétique détectable mais que l'on ne peut pas attribuer sans ambiguïté à une NPBT, le CS différencie le cas où une information précise concernant la modification effectuée est disponible, de celui où aucune information sur la modification n'est accessible :

---

<sup>10</sup> Les plantes issues de SDN3 dans le cas de la cisgénèse essentiellement.

<sup>11</sup> Plante sans transgène descendant d'une plante transgénique (voir fiches techniques).

<sup>12</sup> Effecteurs : Il s'agit des molécules (protéines ou acides nucléiques (ARN ou ADN)) utilisées afin d'obtenir la modification attendue dans la plante (voir Glossaire annexe VI).

- Si une information précise concernant la modification est rendue disponible par l'obteneur : dans ce cas, la traçabilité moléculaire (ADN) est théoriquement possible et le produit, accompagné des informations sur la modification, pourra être identifié sur le plan moléculaire<sup>13</sup> tout au long de la filière. Cependant pour les ségréants négatifs ou certaines conditions de greffes, il restera difficile techniquement d'identifier les modifications. De même, pour les modifications qui peuvent être obtenues également par des techniques ne relevant pas de la modification génétique, les contrôles moléculaires ne pourront pas, à eux seuls, permettre de différencier les modes possibles d'obtention des produits. Seule une traçabilité documentaire le permettrait.
- S'il n'existe pas d'information sur la modification : dans ce cas, pour SDN1 et SDN2, ODM et RdDM<sup>14</sup>, le CS du HCB conclut que, sans documents, la traçabilité sera souvent très complexe voire parfois impossible. En effet, sans données précises sur la traçabilité, les méthodes moléculaires de caractérisation du produit final ne pourront pas permettre de discerner un produit obtenu à partir d'une plante issue de sélection conventionnelle d'un produit obtenu par mutagénèse induite.
- Pour les techniques d'ajout (ou de remplacement) d'ADN (SDN3, cis/intragenèse), des méthodes de détection similaires à celles appliquées à la recherche d'OGM pourront être mises en place, mais pourraient parfois s'avérer compliquées à interpréter dans les cas de combinaison de SDN3 et de cisgenèse par exemple.

### ***Les enjeux pour la coexistence des filières (de la production à la consommation)***

Dans l'éventualité où une politique de coexistence serait instaurée entre une (ou plusieurs) filière(s) NPBT et d'autres (conventionnelle, biologique, « sans OGM », etc.), le CS s'est posé la question de la faisabilité de sa mise en œuvre. Les scénarios exposés par le CS correspondent à des options possibles. Le choix de l'une ou plusieurs des options appartient aux filières et aux pouvoirs publics.

Le CS identifie plusieurs cas de figure, en se concentrant sur les possibilités de détection dans les filières commerciales et leur capacité à coexister :

- En premier lieu, **pour les filières où l'on ne s'intéresserait qu'au produit final**, sans tenir compte de la méthode d'obtention<sup>15</sup>, la notion de filière qui serait définie par rapport à l'inclusion ou non de produits issus de NPBT ne serait pas nécessairement un enjeu.
- **Pour les filières où l'on s'intéresse aux modalités d'obtention des variétés**, bien qu'il ne soit pas toujours possible de détecter sur le plan moléculaire les plantes modifiées par certaines NPBT, une traçabilité documentaire pourrait être mise en place de façon à organiser la coexistence des productions. Un cahier des charges pourrait être proposé dans ces filières.

---

<sup>13</sup> Avec les limites des mesures et selon l'impact d'un processus de transformation industrielle subi par la plante.

<sup>14</sup> Certaines formes de RdDM ne faisant pas appel à l'expression d'un transgène.

<sup>15</sup> Bien que certains caractères comme la tolérance aux herbicides par exemple puissent nécessiter par ailleurs des mesures de gestion spécifiques.

- En deuxième lieu, si la directive 2001/18/CE était interprétée comme **excluant de son champ d'application certaines NPBT**, de nouvelles filières pourraient se mettre en place, où la distinction des caractéristiques moléculaires des produits se ferait sur une base de traçabilité documentaire.
- Dans l'hypothèse où la directive 2001/18/CE serait interprétée comme **incluant certaines NPBT dans son champ d'application**, le CS juge que la question de la détection deviendrait alors primordiale et dépendrait fortement des contraintes techniques exposées plus haut, surtout en cas de produits importés de pays qui utiliseraient les NPBT, ou en cas de recherche de présence fortuite de produits issus de NPBT<sup>16</sup>.
- Pour les cas où une politique de coexistence serait à mettre en place, **et lorsque les modifications génétiques sont détectables**, le CS indique que les mesures de coexistence pourraient reposer sur l'analyse faite dans son [avis sur la coexistence](#). Ces mesures s'appliqueraient en particulier au champ.

### ***Les risques directs pour la santé et l'environnement liés aux caractéristiques nouvelles des produits obtenus***

En réponse à la question des risques posée par la saisine, le CS a mis l'accent sur les **risques directs liés à la technique et aux caractéristiques nouvelles** des produits de NPBT, tout en prenant soin de lister par ailleurs (Annexe V de l'avis) les risques indirects ou communs avec d'autres méthodes d'obtention (OGM ou conventionnelles).

Le CS a identifié trois catégories de risques :

- les risques liés aux **effets « non intentionnels »** de la technique sur le produit final (ex : persistance de l'effecteur ou modifications hors-cible) ;
- les risques liés à **la facilité de mise en œuvre** des NPBT, qui pourraient entraîner une accélération du processus de production et de culture de variétés issues de ces techniques ;
- les risques liés aux **caractères recherchés** (caractères nouveaux, ou modifications de plantes nouvelles en agronomie).

Parmi les risques directs nouveaux, le CS conclut que le risque principal serait lié à la présence, **techniquement évitable**, des effecteurs<sup>17</sup>. Le CS recommande de vérifier l'absence des effecteurs, ce qui est techniquement possible. Le CS rappelle que la persistance des effecteurs dans le génome des plantes en ferait des plantes transgéniques.

---

<sup>16</sup> Par exemple, le seuil de présence des produits issus de plantes produites par NPBT influera sur les possibilités de détection, et comme vu précédemment, dans certaines situations, il ne sera pas possible de conclure sur les méthodes mises en œuvre.

<sup>17</sup> Il s'agit des molécules (protéines ou acides nucléiques (ARN ou ADN) utilisés afin d'obtenir la modification attendue dans la plante.

D'autres risques sont liés à **l'efficacité, à la rapidité, à la possibilité d'obtenir plusieurs modifications génétiques en même temps** (multiplexage), et à la possibilité d'obtenir **des Caractères Nouveaux**<sup>18</sup> qu'offrent ces techniques :

- L'accélération des dynamiques d'obtention de variétés innovantes constitue un élément qui peut être facteur d'amélioration agronomique, mais aussi de risques. En effet, elle aura une incidence sur des systèmes de production et de transformation de la production agricole, que ce soit en termes économiques, sociologiques ou écologiques. Il n'est donc pas exclu qu'elle impacte le fonctionnement et la dynamique des écosystèmes, notamment les services écosystémiques de régulation environnementale, de manière positive ou négative, de nouveaux équilibres étant amenés à s'opérer.
- Par ailleurs, si les NPBT accélèrent l'adoption de nouvelles variétés obtenues par ces techniques et impactant les agrosystèmes, cela pourrait entraîner une difficulté supplémentaire d'adaptation de la biodiversité et des services écosystémiques associés. Ces difficultés d'adaptation seraient en outre augmentées si ces modifications génétiques se disséminaient chez les espèces sauvages sexuellement compatibles avec les variétés cultivées.
- S'agissant des risques **liés aux caractères nouveaux** recherchés : le CS définit comme *Caractère Nouveau*, l'introduction, dans une variété, d'un caractère totalement inédit dans l'espèce même et/ou dans les espèces apparentées<sup>19</sup>. Dans ce cas, le CS **ne peut identifier de risque précis du fait que ces caractères ne sont, par définition, pas encore décrits**. Le CS préconise alors qu'une **évaluation soit organisée au cas par cas**, prenant en compte le caractère introduit ainsi que l'espèce dans laquelle il l'est (voir infra). Dans ce cadre, le CS a discuté d'une probabilité d'effets écologiques non anticipés qui pourrait être plus élevée dans le cas de *Caractères Nouveaux* qui modifieraient profondément le métabolisme des plantes.
- Enfin, le CS aborde la question des modifications du génome par action hors-cible, pour les approches ciblées (SDN et ODM). Une mutation hors de la zone ciblée pourrait, dans certains cas, avoir un effet non recherché sur le phénotype de la plante. Le CS rappelle que les évolutions techniques tendent à réduire considérablement ces modifications hors-cibles. De plus, il rappelle que des modifications non ciblées sont également observées pour d'autres techniques non réglementées et largement utilisées. Ces dernières induisent aussi des mutations en dehors des sites faisant l'objet de la sélection. Le CS ajoute que les mutations hors-cible<sup>20</sup> qui ont un effet phénotypique non souhaitable pourraient être éliminées par des étapes de croisements pour les plantes annuelles. Néanmoins, le CS note que ceci pourrait être difficile voire impossible à mettre en œuvre dans le cas de certaines plantes pérennes

---

<sup>18</sup> La définition de « Caractère Nouveaux » peut être trouvée dans le Glossaire en annexe VI

<sup>19</sup> À titre d'exemple, la caractéristique de tolérance à des herbicides, déjà obtenue par d'autres méthodes au sein de la même espèce, ne constitue pas un caractère nouveau. Dans ce cas particulier, une réflexion transversale sur les modalités d'usage des herbicides pourrait avoir lieu hors des considérations de la technique utilisée.

<sup>20</sup> Ceci s'applique à toutes les mutations non souhaitées, qui apparaissent lors de l'obtention de variétés conventionnelles ou pour les plantes issues de NPBT y compris lorsque la technique est mise en œuvre sur une plante qui avait déjà été modifiée par une NPBT.

ou à propagation essentiellement végétative. Dans ce cas, des données moléculaires complémentaires pourraient être demandées au cas par cas.

***Les mesures de gestion à mettre en place pour prévenir et limiter les risques pour la santé et l'environnement liés à l'utilisation de produits issus de ces nouvelles techniques, si de tels risques sont mis en évidence***

Si des mesures de gestion des risques devaient être mises en place, le CS suggère qu'elles le soient en fonction des résultats de l'évaluation menée sur la base des propositions exposées plus bas<sup>21</sup>.

**Pour les risques liés à la présence des effecteurs :**

Les plantes dans lesquelles des effecteurs seraient toujours présents sont des plantes transgéniques. La directive européenne 2001/18/CE prévoit que ces plantes soient soumises à une évaluation et à des mesures de gestion adaptées (incluant entre autres une vigilance et un suivi post-commercialisation).

**Pour les risques liés aux modifications hors cibles :**

De manière plus générale, le CS rappelle que les obtenteurs réalisent plusieurs rétrocroisements lors de l'introduction d'un caractère dans une variété, ce qui devrait permettre de diminuer de façon sensible les risques liés aux modifications hors cibles. Le CS recommande qu'en cas d'effet non souhaité lié à une mutation hors-cible, des rétrocroisements soient réalisés afin de l'éliminer de la plante mise sur le marché.

**Pour les caractères revêtant une nouveauté telle que définie dans l'avis :**

Une évaluation des plantes présentant un réel caractère de nouveauté devrait être réalisée. Cette évaluation devrait dépendre du caractère introduit. Elle pourrait se faire, en fonction des caractères, et de l'espèce, après examen du dossier, en milieu confiné (*in vitro* ou en mésocosme afin d'examiner les effets sur les interactions écologiques, la biodiversité<sup>22</sup> notamment) et/ou par des essais au champ.

**Pour les risques liés à l'accélération de l'obtention de variétés :**

Une gestion territoriale, avec un déploiement progressif si nécessaire, dans l'espace et dans le temps, de ces plantes présentant un *Caractère Nouveau* devrait être proposée afin de maîtriser le rythme de changement des agro-écosystèmes résultant éventuellement de l'utilisation de ces plantes, surtout pour la dissémination chez les espèces sauvages apparentées sexuellement.

**En ce qui concerne la biovigilance, le CS propose les mesures de gestion suivantes :**

Afin de limiter d'éventuels autres risques non identifiables *a priori*, le CS propose d'instaurer une biovigilance pour les *Caractères Nouveaux* (y compris ceux obtenus par multiplexage). Ce suivi permettra d'acquérir des connaissances sur le comportement de ces variétés lors de mises sur le

---

<sup>21</sup> Voir chapitre 7 de l'avis.

<sup>22</sup> Voir Annexe VI.

marché à grande échelle et à des pas de temps pluri-annuels, en particulier les effets sur la biodiversité. Le dispositif actuel de biovigilance et les réseaux de surveillance appliqués aux pratiques agricoles devraient être adaptés à ces exigences. Au bout d'un laps de temps à définir et selon les observations menées, un bilan devrait être dressé afin de décider s'il y a lieu de maintenir ou non cette biovigilance.

Enfin, le CS souligne la nécessité de conserver et gérer pour chaque espèce, sur le long terme, des pools de ressources génétiques non modifiées par les NPBT<sup>23</sup>.

### ***Scenario de piste intermédiaire entre les dispositions du Catalogue européen et celles de la directive 2001/18/CE***

Après avoir rappelé les dispositifs existants (directive 2001/18/CE – qui impose une évaluation des risques des PGM –, et inscription au Catalogue – qui analyse les valeurs techniques, agronomiques et environnementales des variétés –), le CS se penche sur les dispositifs intermédiaires envisageables.

Si un tel choix était opéré par les décideurs publics, le CS suggère que les opérateurs de la sélection fournissent aux autorités compétentes un dossier contenant les informations moléculaires et phénotypiques concernant leurs produits<sup>24</sup>. En fonction de la modification introduite et en prenant en compte l'historique d'utilisation de telles modifications<sup>25</sup>, un routage pourra être réalisé soit vers une évaluation adaptée aux OGM non exemptés d'évaluation<sup>26</sup>, soit vers une nouvelle forme d'évaluation intermédiaire, soit vers une exemption d'évaluation spécifique (comme pour les OGM exemptés ou l'obtention conventionnelle)<sup>27</sup>. Un tel dispositif permettrait d'adapter les informations demandées et les évaluations menées à la technique utilisée et au caractère conféré à la plante. Des organismes tels que le CTPS<sup>28</sup>, l'ANSES<sup>29</sup>, l'InVS<sup>30</sup> et le HCB pourraient, au plan national, participer à ce routage (qui devrait être en adéquation avec les décisions prises au plan européen).

Indépendamment du stade de développement actuel des techniques, le CS estime que ce ne sont pas seulement les techniques en elles-mêmes qui devraient conditionner le régime d'évaluation, sauf lorsqu'elles conduisent à la production d'OGM au sens de la directive 2001/18/CE. Pour celles qui produisent des plantes et des produits que l'on ne peut distinguer d'autres obtenus par des méthodes différentes et pour certains non réglementés, le CS préconise une évaluation de ces plantes et produits selon leurs caractères, en particulier selon le critère de nouveauté de ce caractère.

---

<sup>23</sup> Les centres de ressources biologiques auront à prendre en compte le développement de variétés issues de NPBT

<sup>24</sup> Voir informations moléculaires demandées dans l'avis du CS.

<sup>25</sup> Si le phénotype existe et est exploité sur le plan agronomique.

<sup>26</sup> Comme prévu dans la directive 2001/18/CE.

<sup>27</sup> Le CS rappelle cependant que l'évaluation par le CTPS suivi de l'inscription au Catalogue français restent un prérequis avant commercialisation.

<sup>28</sup> Comité technique permanent de la sélection.

<sup>29</sup> Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

<sup>30</sup> Institut national de veille sanitaire (maintenant intégré à « Santé publique France » 26/01/16).

# 1. Introduction

## 1.1. Contexte

Le Haut conseil des biotechnologies a été saisi le 22 février 2016 par Ségolène Royal, ministre de l'Environnement, de l'Énergie et de la Mer, et Stéphane Le Foll, ministre de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, de la question des nouvelles techniques d'amélioration des plantes (NPBT) (Annexe I). Dans ce cadre, le Bureau du HCB s'est accordé sur une lettre de cadrage à destination de ses deux comités (Annexe II). Un groupe de travail (GT) *ad-hoc*, dont la composition a été validée par le Bureau après proposition du président du HCB, du Comité Scientifique (CS) et du Secrétariat, a été réuni (Composition du GT en annexe III). Après avoir siégé quatre fois, ce GT a rendu un rapport destiné à préparer les débats du CS. Le rapport a été examiné en séance du CS du 13 juillet 2016. Ce rapport a servi de base aux discussions du CS menées durant les séances du 13/07/16, du 21/09/2016, du 27/10/2016 et du 23/11/2016 qui ont abouti à la rédaction du présent avis par le CS.

Avant d'en venir à la méthode de travail adoptée et au fond des questions posées, on rappellera les points suivants :

Le CS du HCB a pour mission d'éclairer les aspects scientifiques de la saisine, ainsi que les options réglementaires ou législatives qui relèvent de choix politiques.

L'avis du CS est adossé à la recommandation du Comité Économique Éthique et Social (CEES) pour former l'avis du HCB.

L'analyse exposée dans la suite de ce texte doit être lue en considérant que le CS du HCB a travaillé sur une saisine portant presque exclusivement sur l'identification de risques qui seraient liés à l'utilisation de ces nouvelles techniques (nouvelles techniques d'amélioration des plantes, New Plant Breeding Techniques en anglais, NPBT). Dans la perspective d'une décision éclairée en termes de culture de plantes issues de ces techniques, l'évaluation se devait de prendre également en considération les bénéfices des avancées scientifiques et agronomiques produites tout le long de la chaîne de valeur et qui pourraient émerger de la production de plantes issues de ces techniques.

Il est important de noter que le texte du CS du HCB s'applique aux variétés (cultivées) de plantes d'intérêt agronomique. **Ainsi, les techniques discutées ici le sont dans l'objectif de l'obtention de variétés cultivées et non de la modification d'espèces sauvages.** De plus, le texte concerne l'utilisation de ces techniques lorsqu'elles ont permis l'obtention de plantes d'intérêt agronomique qui seront cultivées en dehors d'un laboratoire de recherche. Le CS du HCB rappelle donc que ce texte concerne les plantes qui seraient possiblement mises en culture sans confinement<sup>31</sup>. Les plantes intermédiaires, non destinées à l'inscription au Catalogue Officiel Français des Espèces et Variétés et cultivées en laboratoire à des fins de recherche ou sous serre de confinement, ne sont pas couvertes par le présent texte. En laboratoire, la modification des plantes fait l'objet de déclarations

---

<sup>31</sup> En laboratoire, la réglementation française (Décret n° 2011-1177 du 23 septembre 2011 relatif à l'utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés) impose une déclaration des manipulations et un confinement adapté aux organismes modifiés.

et d'un suivi spécifiques, dans le cadre de la réglementation des activités de recherche et de développement.

Le CS rappelle que toutes les pratiques agronomiques, en particulier celles qui, par leur adoption, modifient l'étendue des cultures ou celles qui associent l'utilisation de molécules de synthèse ou naturelles, influent sur le devenir des biotopes des espèces sauvages.

## **1.2. Méthode de travail**

L'avis du CS a été rédigé pour rendre compte des discussions en séances<sup>32</sup>. Le projet d'avis initial était proposé par le Secrétariat à partir du rapport du groupe de travail (GT). Les discussions qui ont eu lieu en séance et les débats, y compris les éventuelles controverses sont rendues visibles dans les sections concernées. Dans son travail, le CS a considéré les remarques du GT, y compris celles qui n'avaient pas fait l'unanimité. Par ailleurs le CS a mis à jour les [fiches](#) concernant l'ensemble des techniques discutées, ces dernières accompagnaient le [rapport provisoire du CS sur les NPBT](#). La rédaction de cet avis se fait suivant un plan reprenant l'ordre des questions qui étaient adressées au CS par la saisine.

## **1.3. État de l'art et questions sur le point de la variation naturelle et des mutations<sup>33</sup>**

L'essor de nouvelles technologies végétales, avec la conception et la mise en œuvre de nouvelles méthodes d'amélioration des plantes pose un certain nombre de questions. La question des « NPBT » (*New Plant Breeding Techniques*, nouvelles techniques d'amélioration des plantes) débattue aujourd'hui en Europe, a été soulevée dans le cadre d'une interrogation sur l'encadrement réglementaire des produits issus de la mise en œuvre de procédés « nouveaux » d'amélioration génétique. Il existe en effet une interrogation quant à leur éventuelle inclusion dans le champ d'application des directives relatives aux OGM<sup>34</sup>. Cette question est importante voire déterminante pour l'adoption de ces techniques. Il est par ailleurs important d'en clarifier les termes et descriptions pour l'information de l'ensemble des acteurs, y compris les filières et les consommateurs.

Notons que du fait de l'historique du sujet<sup>35</sup>, la liste des techniques discutée est hétéroclite<sup>36</sup>, et leur appellation « *New Plant Breeding Techniques* » peut prêter à confusion. Ainsi :

---

<sup>32</sup> 13/07/16, 21/09/2016, 27/10/2016 et 23/11/2016

<sup>33</sup> Ce chapitre reprend des données fondamentales de génétique moléculaire, il doit être lu, comme l'ensemble de l'analyse, en considérant que les propositions qui seront faites sont restreintes aux plantes cultivées.

<sup>34</sup> Les directives européennes relatives à l'utilisation des OGM sont (1) la directive 2001/18/CE relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement, et (2) la directive 2009/41/CE relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés.

<sup>35</sup> Rapport initial du COGEM en 2006 suivi de la mise en place d'un groupe de travail à la Commission européenne et de la publication dans un journal à haut facteur d'impact (*Nature Biotechnology*) des résultats de la réflexion parallèle du Centre Commun de Recherche de la Commission (Lusser *et al.*, 2012).

Si elles s'appliquent toutes à l'amélioration des plantes, les techniques considérées ne sont pas nécessairement spécifiques du domaine du végétal : l'application des nucléases dirigées (SDN pour *site-directed nucleases*, ou techniques d'édition des génomes) est également très développée dans le monde animal et en médecine ;

Ces techniques ne sont pas nécessairement nouvelles : ainsi, la technique de la greffe n'est pas nouvelle, mais la question de savoir si des produits issus de la greffe d'un greffon non-génétiquement modifié (non-GM) sur un porte-greffe génétiquement modifié (GM), doivent être considérés comme génétiquement modifiés se pose :

- certains items de la liste ne sont pas des techniques *per se* mais correspondent à l'utilisation de techniques de génétique : par exemple, des stratégies innovantes d'amélioration des plantes (*reverse breeding* par exemple). Leur statut pose alors la question réglementaire (ségréants négatifs par exemple) ;
- une complexité supplémentaire vient du fait de la possibilité de combinaisons entre lesdites techniques (cisgenèse ciblée à l'aide de SDN3 par exemple).

Sur la base des techniques en discussion à la Commission européenne, cet avis concerne, les<sup>37</sup> :

i) Nouvelles techniques de modifications ciblées du génome :

(a) Nucléases dirigées sur des sites spécifiques du génome (**SDN**<sup>38</sup> : **ZFN**<sup>39</sup>, **MN**<sup>40</sup>, **TALEN**<sup>41</sup>, **CRISPR**<sup>42</sup>/**Cas9**)

(b) **Mutagenèse dirigée par oligonucléotides** (ODM<sup>43</sup>, RTDS<sup>44</sup>, ...)

ii) Techniques exploitant les mécanismes épigénétiques :

**Modulation de l'expression des gènes par RdDM**<sup>45</sup>

---

<sup>36</sup> Liste de techniques discutées par le groupe de travail de la Commission européenne : Oligonucleotide Directed Mutagenesis (ODM), Zinc Finger Nuclease Technology (ZFN), Cisgenesis (comprising Cisgenesis and Intragenesis), Grafting, Agro-infiltration, RNA-dependent DNA methylation (RdDM), Reverse Breeding, Synthetic Genomics. Le lecteur pourra se reporter aux [fiches](#) présentant ces techniques

<sup>37</sup> Les éléments faisant l'objet d'une fiche spécifique sont signalés en gras. Une fiche supplémentaire est dédiée à la transgenèse « classique » pour comparaison.

<sup>38</sup> SDN : Site-Directed Nucleases

<sup>39</sup> ZFN : Zinc Finger Nuclease

<sup>40</sup> Les méganucléases (MN) n'ont pas fait l'objet d'une fiche descriptive en annexe car le groupe de travail a estimé que la technique était déjà dépassée par les autres outils de modification ciblée.

<sup>41</sup> TALEN : Transcription activator-like effector nuclease

<sup>42</sup> CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

<sup>43</sup> ODM : Oligonucleotide Directed Mutagenesis

<sup>44</sup> RTDS : Rapid Trait Development System

iii) Considérations d'éléments annexes à l'utilisation de techniques de modification génétique quelles qu'elles soient :

(a) Contextes particuliers d'utilisation de techniques de modification génétique :

1. **Agroinfiltration**

2. **Grefe** d'un scion non-GM sur un porte-grefe GM ou d'un scion GM sur un porte-grefe non-GM

(b) Nouveaux concepts associés à la nature de la séquence modifiée :

**Cisgénèse / Intragenèse**

iv) Considération de la descendance d'individus modifiés dans lesquelles la modification génétique a été éliminée par ségrégation :

**Ségrégants négatifs**, produits dans le cadre de stratégies de sélection innovantes (*ex : Reverse breeding, diverses méthodes d'accelerated breeding, Seed Production Technology...*).

La nouveauté des caractères conférés par ces techniques peut poser question et le CS souhaite distinguer deux types de nouveautés :

- L'introduction, dans une variété, d'un caractère identifié dans une autre variété ou dans une espèce proche ou compatible sexuellement : il s'agit alors de valoriser la diversité génétique existante par l'introduction de formes d'allèles d'intérêt. Il n'y a donc pas d'ajout<sup>46</sup> de séquences génétiques, ni de modification de la fonction des gènes existant chez la plante. **Il sera appelé « caractère nouveau dans la variété ou dans l'espèce ».**
- L'introduction d'un caractère totalement inédit dans la variété et/ou des espèces proches<sup>47</sup> : le caractère nouveau vient du fait que le gène n'a pas été identifié dans l'espèce considérée ou que la modification d'un gène déjà présent introduit une voie métabolique nouvelle ou une fonction nouvelle dans l'espèce. **Il sera appelé « Caractère Nouveau » dans ce document.**

### **1.3.1. Caractérisation générale des NPBT :**

---

<sup>45</sup> RdDM : RNA-dependent DNA methylation

<sup>46</sup> Le concept d'ajout est important à clarifier pour la cisgénèse et l'intragenèse. Du matériel génétique peut être introduit mais les gènes apportés préexistent sous une forme allélique différente dans l'espèce ou sont présents dans certaines variétés de la même espèce.

<sup>47</sup> Cette distinction est mise en avant dans la réglementation Canadienne sur les OGM qui ne prévoit une évaluation que pour les variétés qui présentent un *Caractère Nouveau* qui ne préexiste pas dans la variété ou espèce proche. ( <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/gmf-agm/index-fra.php> )

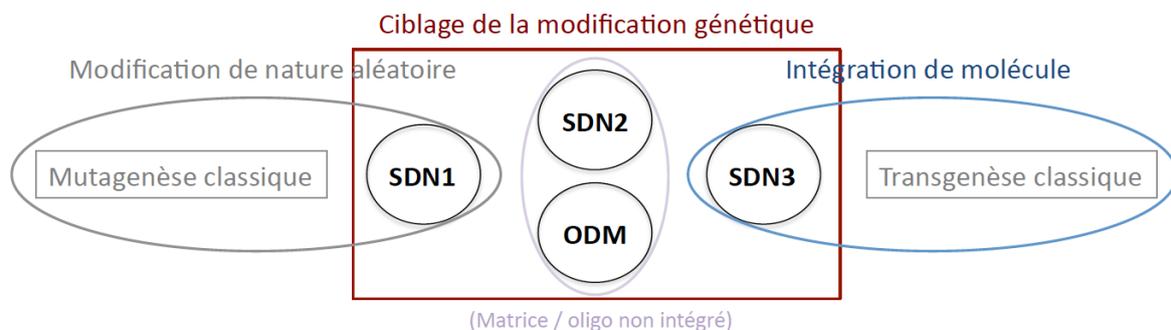
- Techniques de modifications ciblées du génome

Le ciblage moléculaire de la localisation génomique des modifications génétiques est la caractéristique significative de certaines des nouvelles techniques (SDN : ZFN, MN, TALEN et CRISPR Cas9 (voir [fiches descriptives](#) sur le site du HCB ainsi que le [rapport provisoire du CS](#)).

Le ciblage peut être obtenu par le biais de nucléases dirigées vers une séquence choisie de l'ADN pour atteindre trois objectifs :

- (1) la mutation aléatoire (insertion ou délétion) ponctuelle ou d'un petit nombre de nucléotides (un à quelques dizaines), **tout en étant ciblée** à un site particulier du génome, **dit SDN1** ;
- (2) la **conversion allélique**, consistant à modifier la séquence d'un gène donné sur tout ou partie de sa séquence, **dit SDN2** ;
- (3) l'intégration ciblée d'une séquence d'ADN, **dit SDN3**.

Le schéma ci-dessous permet d'inscrire certaines techniques dans le paysage actuel (Figure 1) :



**Figure 1.** Les nouvelles techniques d'amélioration des plantes : L'application SDN1 se distingue de la mutagenèse classique en ce qu'elle est ciblée en un site donné du génome ; elle conduit le plus souvent, mais pas exclusivement, à la perte de fonction du gène ciblé. À cette fin, les nucléases dirigées sont introduites dans la cellule pour cibler un site de mutation, sans en prédéfinir la nature. Dans l'application SDN2, l'introduction dans la cellule d'une matrice d'ADN, en plus des nucléases dirigées, permet de définir précisément la nature de la modification induite. La matrice n'est pas intégrée au génome. Le même objectif peut être réalisé par la technique de mutagenèse dirigée par oligonucléotides (ex : ODM, RTDS). L'application de la technique SDN3 permet l'intégration ciblée d'une séquence. C'est ce ciblage du site d'insertion du transgène qui distingue cette technique de la transgénèse classique. (SDN : Site Directed Nuclease)

- Technique exploitant les mécanismes épigénétiques

La technique de RdDM (**RNA-dependent DNA methylation**), vise par des changements épigénétiques<sup>48</sup> à moduler l'expression d'un gène donné de plante (l'augmenter ou la diminuer) sans en modifier la séquence nucléotidique. Il peut en résulter des variations d'activités métaboliques par exemple. Il est aussi possible de modifier l'expression d'un gène d'un organisme interagissant avec une plante, ceci permettant de cibler un pathogène par exemple. Le CS souligne que de nouvelles

<sup>48</sup> L'épigénétique définit les mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de l'expression d'un caractère codé génétiquement. Dans le contexte de ce document, ce sont les modifications par méthylation de l'ADN qui sont concernées. Ces modifications de l'ADN sont réversibles et si elles sont transmissibles d'une génération à l'autre, les conditions du maintien dépendent de l'environnement. D'autres modifications sont possibles sur les protéines qui sont associées à l'ADN.

approches sont possibles et que ces modifications épigénétiques peuvent être obtenues par le biais de l'expression ou du transfert transitoire ou stable d'un transgène ou de protéines spécifiques (ex : par agroinfiltration, système CRISPR avec une protéine de fusion ayant une activité de méthyltransférase (CAS9-MT) ou par une modification induite par une infection virale transitoire (VIGS)). En cas de transfert transitoire<sup>49</sup>, la modification épigénétique de modulation d'expression d'un gène peut être transmise sur quelques générations.

- Autres techniques

Les autres techniques sont en fait des méthodes : agroinfiltration « **sans reproduction** », greffe de plantes issues de l'ingénierie, cisgénèse/intragenèse et élimination, dans le cadre de stratégies de sélection innovantes, de matériel génétique par ségrégation lors de croisements classiques (ségréchants négatifs) dont le statut doit être clarifié.

### **1.3.2. Questions soulevées par les NPBT**

*Dans la partie qui suit certains experts ont souhaité contextualiser la signification de la notion de mutation et de variation. Un expert a souhaité que l'on aborde la question du type de mutations observées. Ainsi, la discussion a porté sur la possibilité que des mutations non observées dans la nature puissent ou non être obtenues par l'utilisation de NPBT. La question de l'apparition de ces mutations et de leur maintien a été soulevée et a permis l'écriture des paragraphes qui suivent (1.4).*

Considérant le cadre actuel de la réglementation européenne sur les OGM, les interrogations relatives au statut réglementaire des techniques mentionnées concernent notamment leur similarité avec des techniques assujetties aux dispositions de la réglementation en vigueur (principalement la directive européenne 2001/18/CE). La Commission européenne devrait statuer sur le fait de savoir si ces techniques sont considérées comme générant un OGM ou non, selon la définition de la directive 2001/18/CE, et si elles doivent être réglementées en tant que telles, ou si elles seraient exemptées d'évaluation.

Ainsi, le statut OGM d'un produit lui est conféré lorsqu'il est obtenu par des techniques impliquant notamment une **insertion de nouvelle(s) molécule(s) d'ADN recombinant**. Les textes réglementaires ont pris en considération la **mutation induite**. Les produits de mutagénèse sont exemptés d'évaluation en raison d'un historique d'utilisation qui n'a pas révélé de risque spécifique.

La capacité de **ciblage** des modifications dans le génome, offerte par certaines NPBT, pourrait être mise en avant pour justifier un allègement réglementaire en matière d'exigences d'évaluation.

La capacité de **multiplexage**, c'est-à-dire de réaliser plusieurs modifications du génome en une seule étape afin, principalement, d'obtenir un *Caractère Nouveau*, doit aussi être prise en compte.

La question de la **transmission** et de l'**héritabilité** de la modification est à considérer :

---

<sup>49</sup> Une expression plus durable est possible, par une intégration dans le génome par transgénèse ou par intégration ciblée de type SDN3. Le caractère non permanent de la modification est de nouveau observé si l'on élimine le transgène par ségrégation.

(1) présence transitoire (de courte durée, quelques heures à quelques jours, dans une cellule et non transmise de génération en génération) à l'opposé de la transmission héritable de la modification génétique. Ceci couvre aussi une modification de cellules somatiques à l'opposé de germinales, (une modification de cellules somatiques peut également se transmettre par propagation végétative),

(2) présence transitoire *versus* héritable des conséquences épigénétiques d'une modification génétique (des modifications épigénétiques peuvent être induites sans nécessiter d'insertion stable de matériel génétique dans le génome ; dans le cas d'une insertion stable, elles peuvent néanmoins se transmettre après l'élimination du gène inducteur par ségrégation),

(3) présence transitoire *versus* héritable d'ADN recombinant nécessaire à l'obtention de la mutation.

Une autre série de questions concerne la **détection** de produits issus d'une technique donnée. Si les techniques moléculaires de détection ne permettent pas de distinguer les techniques à l'origine des produits, des méthodes de **traçabilité** non liées à l'ADN (traçabilité technique ou administrative) pourraient alors donner des indications.

La question **des moyens de gestion** des éventuels risques se pose elle aussi. S'ils existent, les risques propres aux NPBT devront être identifiés et des méthodes de gestion adaptées et proportionnées pourront être proposées.

Comme évoqué précédemment, la législation européenne est débattue dans le cadre de l'évolution continue des techniques de modification génétique. La question de la nécessité d'une évaluation se pose surtout si l'on ne peut pas distinguer un organisme d'un autre obtenu par des pratiques qui ne seraient pas soumises à évaluation.

#### ***1.4. Considérations sur la variation génétique naturelle au sein d'une espèce végétale***

Pour les produits issus de NPBT, la question des différences entre la variabilité naturelle et la variabilité obtenue à l'aide de ces techniques se pose. Définir la notion de variabilité est essentiel pour la compréhension de l'évaluation des bénéfices et des risques liés aux techniques classiques et nouvelles.

La question de la variabilité est pertinente pour répondre aux enjeux d'évaluation :

- En termes de risques, les modifications moléculaires induites par les NPBT sont-elles qualitativement et/ou quantitativement différentes de celles qui résultent de la variabilité naturelle ou de celles qui résultent des techniques classiques de sélection des plantes ?
- En termes d'identification/détection, comment distinguer les événements liés à la mise en œuvre des NPBT dans un contexte de variabilité naturelle ou de sélection classique ?
- Ces deux questions se posent aussi en fonction de la présence de mutations additionnelles (hors-cibles).

##### ***1.4.1. L'origine des variations génétiques***

En biologie, la transmission génétique des caractères d'une génération à l'autre repose sur la transmission du génome (nucléaire et cytoplasmique). La séquence primaire du génome, c'est-à-dire l'enchaînement des nucléotides composant la molécule d'ADN en est le support. Des modifications

épigénétiques, qui modifient la structure chimique des nucléotides ou de la chromatine mais pas leur enchaînement, interviennent pour moduler l'expression du génome.

Les génomes sont sujets à des modifications, allant du changement d'une simple base jusqu'à des modifications profondes comme des délétions, des duplications, des insertions de grands fragments d'ADN, ou des réarrangements chromosomiques, qui influent sur la séquence primaire du génome. Ces modifications résultent, entre autres mécanismes, d'erreurs de la réplication ou de la réparation de l'ADN, de la mobilisation d'éléments transposables, ou encore d'événements de recombinaisons chromosomiques associés à la reproduction sexuée.

Ce phénomène de modifications naturelles du génome est universel et s'applique à tous les organismes vivants (micro-organismes, animaux, végétaux), avec une fréquence qui dépend de l'organisme (cette fréquence est par exemple d'une mutation pour 100 millions de paires de bases environ à chaque génération chez la plante *Arabidopsis thaliana* (Lynch, 2010)). Par conséquent, pour une plante possédant un petit génome comme *Arabidopsis thaliana*, le génome de chaque nouvelle graine porte en moyenne une mutation par rapport au génome de la graine qui lui a donné naissance (Ossowski et al., 2010). Si l'on extrapole de façon linéaire à un génome 120 fois plus important, comme celui du blé par exemple, ce nombre serait d'environ 120 mutations par grain. Dans un hectare de blé contenant environ un million de pieds, l'étude des génomes de toutes les graines récoltées montrerait alors au minimum 120 millions de mutations par rapport aux génomes des grains initialement semés. La conséquence de ce calcul théorique est que, statistiquement, dans l'ensemble des génomes de la population des grains récoltés dans un hectare de blé, tous les gènes porteraient une mutation sur leur séquence d'ADN par rapport aux grains semés.

En d'autres termes, en cultivant un hectare de blé, l'agriculteur pourrait statistiquement obtenir une mutation de chaque gène du blé (Dans la réalité, la répartition de ces mutations est hétérogène (voir 1.4.3)).

Une grande partie de ces modifications ne peut être ni associée ni corrélée à des variations phénotypiques ayant un impact mesurable sur l'organisme ou sur l'écologie de la population à laquelle appartient cet organisme. La plupart de ces mutations sont pour l'instant ainsi qualifiées de "silencieuses", soit qu'elles le soient réellement, soit que les moyens d'observation dont nous disposons ne nous permettent pas d'en visualiser les effets.

Pour un blé, et plus généralement pour l'ensemble des variétés cultivées et améliorées par l'homme, si la récolte est entièrement consommée, ces mutations n'ont jamais l'occasion de s'exprimer dans une descendance. Si une partie de la récolte est re-semée ou utilisée à des fins de sélection, une partie des mutations sera donc présente dans sa descendance. Les mutations qui ont un effet sur le phénotype (elles sont dites alors "non silencieuses"), si elles ne sont pas létales, ne persisteront généralement dans la descendance que si elles sont sélectionnées et apportent un caractère recherché par le sélectionneur. Les mutations "silencieuses" (*i.e.* qui n'ont pas d'effet sur le phénotype) évolueront de la même façon que celles des plantes non cultivées, décrites dans le chapitre suivant.

Ce raisonnement concernant l'occurrence de mutations spontanées sur le blé est valable pour tous les organismes vivants. La séquence de bases de l'ADN est sujette à mutations et le patrimoine

génétique de chaque espèce<sup>50</sup> comporte un grand nombre de variations, certaines silencieuses, d'autres pas. Ces mutations sont soit présentes dans les gamètes et donc transmises à la descendance, soit présentes dans le génome des cellules somatiques et donc non transmises.

De manière similaire, les travaux portant sur les modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN, modification des protéines histones associées) révèlent qu'il peut exister des modifications épigénétiques transmissibles qui sont soumises à des variations au sein des populations.

#### **1.4.2. Le devenir des variations génétiques : l'évolution naturelle (sans intervention volontaire de l'homme)**

Le nombre des variations génétiques n'est potentiellement limité que par le taux de mutation spontanée. Mais en réalité, dans un environnement donné, la variation qui se maintient dans les populations naturelles résulte d'un équilibre entre (1) les processus qui tendent à augmenter la variation : la mutation et, de façon similaire, la migration entre populations différentes, et (2) les processus qui tendent à diminuer la variation : la dérive génétique (l'accumulation de variations est limitée par la taille finie des populations) et la sélection naturelle.

Les mutations silencieuses qui apparaissent dans les régions qui ne sont ni codantes ni régulatrices ainsi que les mutations synonymes dans les régions codantes (n'induisant pas de substitution d'acide aminé et donc pas de changement dans la séquence des protéines codées par ces gènes) sont considérées comme « neutres » : elles ne modifient pas le phénotype et ne sont pas affectées par la sélection naturelle. Selon la théorie neutraliste (Kimura, 1984), la diversité génétique, définie comme la proportion de sites variables entre 2 séquences prises au hasard dans une population, peut s'expliquer par le taux de mutation et la taille de la population. Elle est généralement comprise entre 0.01% et 5% (Gouesnard et al., 2005).

#### **1.4.3. Hétérogénéité de la variation au sein des génomes**

Les séquences codantes et les séquences non codantes régulatrices ont un taux d'évolution en moyenne plus lent que les non codantes (car la sélection négative prédomine) et leur ordonnancement dans le génome est stable au sein d'une espèce. Au contraire les séquences non codantes, ne participant pas à la régulation de l'expression de gènes, qui sont majoritaires (jusqu'à 98 % du génome chez le maïs par exemple) évoluent à des taux en moyenne bien supérieurs et comportent souvent des éléments mobiles.

En ce qui concerne les séquences codantes, le degré de variation est hétérogène d'un gène à l'autre, et est affecté par la fonction du gène et la sélection naturelle. Cette dernière repose sur la variation de l'environnement et/ou de l'environnement du gène au sein du génome. La recombinaison produit

---

<sup>50</sup> Chez les êtres humains, deux individus diffèrent entre eux par environ 3 millions de variations génétiques, et au sein d'un même individu on observe jusqu'à 1500 mutations somatiques par cellules (*Science*, 25/09/2015 vol 349, issue 6255).

sans cesse de nouvelles combinaisons de gènes, et donc de nouvelles variations phénotypiques (la plupart des caractères sont multigéniques : leur valeur est déterminée par la combinaison de nombreux gènes).

#### **1.4.4. La variation intra- et interspécifique**

La variation génétique entre individus et populations d'une même espèce est en général moins importante que les différences génétiques entre les espèces. Néanmoins, les espèces ne sont pas des entités indépendantes, ni forcément isolées. Les espèces proches (ayant divergé récemment à l'échelle des temps évolutifs) partagent une partie des variations héritées de leurs espèces ancêtres. De plus, des hybridations entre différentes espèces de plantes sont possibles, de nouvelles variations peuvent ainsi être échangées entre les espèces ; ceci reste cependant rare entre les variétés cultivées et les espèces sauvages (Andersson and de Vicente, 2010; Dempewolf et al., 2012)<sup>51</sup>.

#### **1.4.5. Sélection par l'Homme et évolution des espèces cultivées**

La variation génétique permise par l'apparition naturelle constante de modifications dans les génomes est la base de l'évolution des organismes. C'est également dans cette variation génétique intra-spécifique et inter-spécifique que les sélectionneurs de variétés puisent pour améliorer les plantes.

Réunir la meilleure combinaison de caractères pour une espèce et un environnement donnés a été l'enjeu essentiel de la domestication et de la sélection des plantes et des animaux depuis plus de 10 000 ans. Le nombre très grand de combinaisons de la variabilité génétique résultant de la mutagenèse naturelle offre de nombreuses possibilités d'amélioration, mais c'est aussi une difficulté car il peut nécessiter de devoir éliminer des variations qui contrecarrent les effets de la sélection. Des progrès de la génomique chez les plantes (Kole et al., 2015) pourraient, dans les années à venir, constituer éventuellement une alternative, un complément aux NPBT ou un élément de combinaison.

*Un membre du CS souhaite ajouter que, la distribution des mutations ciblées diffère de celle des mutations naturelles, au moins selon trois critères :*

- *La localisation génomique,*
- *le type de mutation selon la technique SDN (proportion d'insertions, de délétions, de substitutions, et leur résultante en termes de mutations synonymes ou non synonymes),*
- *la valeur sélective qu'elles auraient chez des échappées de culture, ou chez les espèces apparentées, sexuellement compatibles avec la variété cultivée porteuse de la NPBT.*

---

<sup>51</sup> Même si cela est moins rare entre les plantes sauvages (Whitney et al., 2010)

*La distribution des mutations obtenues par mutagenèse conventionnelle est, elle-même, différente de celle des mutations ciblées et des mutations naturelles.*

#### **1.4.6. Mutations ciblées, hors cibles et variation naturelle**

Les changements induits par les techniques SDN reposent sur une cassure double brin de l'ADN.

- Dans le cas de SDN1, les plantes sélectionnées présentent une mutation ciblée, il s'agit essentiellement de micro-délétions et micro-insertions, ces changements sont le plus souvent associés à l'inactivation d'un gène. Les variants naturels du même gène inactif ont une diversité moléculaire plus grande. Ces mutations incluent les micro-délétions, micro-insertions mais aussi des substitutions, translocations, et d'autres remaniements.
- Dans le cas des SDN2 et ODM, les mutations introduites sont la reproduction de variations observées dans la diversité génétique, et qui auront été choisies pour être associées à un phénotype d'intérêt agronomique. Un même phénotype peut être obtenu à partir de mutations différentes.

Ainsi, pour un gène donné, les mutations issues des SDN1 et SDN2 ou ODM peuvent être identiques ou non, à celles qui sont observées dans les variétés cultivées.

Un membre du CS a posé la question, dans le cadre des SDN, des caractéristiques des mutations hors-cibles. La question porte sur le fait que celles-ci pourraient être d'une nature différente des mutations observées en l'absence de manipulation, et qu'elles pourraient toucher des régions du génome de faible variation naturelle et notamment des régions des génomes non caractérisées. Le CS note que, comme cela est développé par ailleurs dans le texte, les mutations hors-cibles ont les caractéristiques suivantes :

- Elles sont observées dans des séquences proches (1 à 5 différences nucléotidiques selon les techniques) des séquences cibles. Elles sont donc informatiquement prévisibles dans les génomes connus, ou identifiables par séquençage des cellules modifiées ou peuvent être recherchées par des techniques dédiées (avec une certaine complexité).
- La nature biochimique des mutations hors-cible est identique à celle des variations naturelles. Les SDN entraînant des coupures double brin de l'ADN, ce sont les systèmes de réparation physiologiques qui sont mis en œuvre.
  - Le fait que certaines régions du génome ne varient que peu vient de l'importance fonctionnelle de ces régions (pression de sélection négative). Des effets dus à une mutation hors-cibles dans ces régions seraient donc, selon toute vraisemblance, associées à un phénotype que le sélectionneur pourrait choisir de conserver ou non.
  - Si l'on observe préférentiellement quelques types de mutations à des sites donnés (par exemple des variations du nombre de répétitions dans les régions répétées) cela provient des mécanismes impliqués dans la genèse de ces mutations mais n'est pas indicateur d'un risque particulier. Une cassure par SDN dans ces régions aurait donc des conséquences identiques à celle d'une cassure naturelle suivie de la réparation physiologique.

- Pour les SDN2 et 3 la conséquence d'une mutation hors-cible sera très probablement identique à celle qui serait observée dans un contexte de SDN1 car la probabilité que l'ADN matrice présent puisse recombiner dans la région coupée est très faible. Ce raisonnement s'applique aux mutations hors-cible que l'on pourrait observer dans le cas des ODM, où une homologie de séquence est nécessaire à l'action des oligonucléotides.

## 2. Définition des termes et techniques

Afin de pouvoir appréhender les questions discutées dans ce document une connaissance des techniques est indispensable. Le CS a donc établi des [fiches techniques](#) à cet effet<sup>52</sup>.

Ces fiches ont été mises à jour avec les compléments apportés par le groupe de travail et en séance du CS. Elles présentent pour chaque technique, une explication au niveau cellulaire et moléculaire, les modalités de mise en œuvre, les utilisations possibles, les avantages et contraintes en comparaison à des techniques existantes, les méthodes de détection et traçabilité, les stades de développement et des informations générales complémentaires.

Pour des raisons d'homogénéité, le CS du HCB a choisi de donner à certains termes, qui pourraient être utilisés dans d'autres cadres une acceptation particulière précisée dans le glossaire en annexe VI. Pour éviter toute confusion le CS tient à préciser que le glossaire ne s'applique qu'à cet avis.

### 2.1. Multiplexage et obtention simultanée de plusieurs modifications spécifiques de sites

Les techniques SDN permettent d'effectuer simultanément plusieurs modifications des génomes.

#### Sur un locus :

Pour SDN2 l'usage d'une « matrice de réparation » comprenant une combinaison de plusieurs mutations/insertions/délétions sur un même locus produirait une plante qu'il serait très difficile voire statistiquement impossible d'obtenir par mutagenèse au hasard ou sélection de mutations naturelles. On notera que la présence de plusieurs mutations en un locus donné peut exister naturellement. Le multiplexage peut aussi être utilisé pour permettre la traçabilité des modifications<sup>53</sup>. Enfin, en dehors de ce contexte, un tel multiplexage aurait pour intérêt de modifier la fonction d'un gène : il s'agirait alors d'un *Caractère Nouveau*.

De même la technique SDN3 permet l'insertion en un seul locus de plusieurs transgènes. Tous les transgènes seront transmis à la descendance comme un locus unique.

#### Sur plusieurs loci :

Les techniques SDN peuvent être appliquées simultanément sur plusieurs régions du génome par l'introduction de plusieurs nucléases et/ou ARN guides et de plusieurs matrices de réparation

---

<sup>52</sup> Ces fiches ont été mises à jour avec les compléments apportés par le groupe de travail et en séance du CS.

<sup>53</sup> Traçabilité par combinaison d'une séquence ADN spécifique sans changer la séquence de la protéine codée.

(Raitskin and Patron, 2016). On obtient ainsi des modifications génétiques contrôlées de plusieurs gènes ou séquences. Cela permettrait par exemple l'inactivation simultanée des différents allèles d'un gène dans des plantes polyploïdes (le blé hexaploïde, par exemple) (Wang et al., 2014), ou le ciblage de familles de gènes, ou enfin, la modification de gènes impliqués dans une même voie métabolique. Il serait également théoriquement possible d'obtenir des produits nouveaux<sup>54</sup> par modification d'une série de gènes ou par mutagenèse d'un gène pour en changer la fonction.

À l'heure actuelle et dans un avenir proche, il est important de noter que 1/ Les capacités à vectoriser aisément les effecteurs de SDN (1,2 ou 3) sont une limite importante dans la capacité à produire ce multiplexage. 2/La création de fonctions nouvelles reste avant tout du domaine de la recherche.

## **2.2. Limites entre SDN1, 2 et 3**

La classification en SDN1, SDN2 ou SDN3 des diverses stratégies de modification du génome permet de décrire aisément les caractéristiques associées à chaque technique : celle-ci a fait l'objet de discussions et le CS s'accorde, ici sur le fait que :

- SDN2 se différencie de SDN1 par l'utilisation d'une matrice qui permet la modification par recombinaison d'un gène cible visé par la cassure causée par la nucléase ;
- SDN2 se différencie de SDN3 du fait que, dans le cas de SDN2, le gène modifié est présent chez la plante, il reste à son emplacement dans le génome, et son nombre de copies n'est pas modifié ;
- La limite entre SDN2 et SDN3 n'est pas nécessairement claire. Avec SDN2, les nouvelles séquences d'ADN obtenues pourraient, par exemple conduire à la formation d'un nouvel ARN (même court, comme un petit ARN) ou à de nouvelles régulations d'expression d'un ARN tout comme avec SDN3. Le niveau de similarité requis pour distinguer SDN2 de SDN3 devra être défini au cas par cas si cela s'avérait nécessaire sur le plan réglementaire (voir 7.).

## **2.3. Considérations sur l'introduction des effecteurs dans la cellule cible et sur la vectorisation**

La question des vecteurs, de l'entrée des effecteurs et/ou de leur persistance dans la cellule est essentielle dans le cadre de la réflexion liée aux risques et à la traçabilité des variétés obtenues par les nouvelles techniques. En effet, la persistance de vecteurs et/ou d'effecteurs peut avoir une influence sur le risque (voir la section 5.2.1) mais peut aussi, dans certains cas, être utilisée pour l'identification d'un produit issu de ces techniques (voir 3.3).

À l'heure actuelle, il existe plusieurs méthodes de vectorisation pour introduire les effecteurs.

---

<sup>54</sup> Voir le paragraphe sur la nouveauté en introduction (1.3).

### **2.3.1. Transformation par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens***

La bactérie *Agrobacterium tumefaciens* induit la "galle du collet" chez certaines plantes. Dans le cas de l'utilisation de cette bactérie pour la transformation des plantes, les gènes de l'ADN-T du plasmide Ti<sup>55</sup> sont remplacés et la souche est incapable d'induire la maladie (Simpson et al., 1986).

L'agrobactérie portant la construction à transférer est mise en contact avec les cellules de la plante et y transfère l'ADN-T recombinant dans le noyau. Diverses techniques (voir annexe VII) permettent de sélectionner les cellules transformées, puis de les régénérer en plante entière. Pour certaines espèces, il est possible d'appliquer l'agrobactérie sur les organes floraux, de laisser les fruits se développer et de sélectionner les graines transformées (on peut alors obtenir jusqu'à quelques pourcents de graines transformées parmi l'ensemble des graines produites (Bechtold et al., 1993). Dans le cadre des NPBT, les agrobactéries sont mises en contact avec des tissus qui ne seront pas utilisés pour la reproduction mais qui seront broyés pour extraire un métabolite d'intérêt (vaccin...).

### **2.3.2. Transformation directe**

Les techniques de transformation directe regroupent l'ensemble des méthodes utilisées pour introduire des macromolécules dans les cellules végétales par des moyens physique ou chimique, sans utilisation d'*Agrobacterium*.

- Transformation de protoplastes

Les cellules végétales sont débarrassées de leur paroi pecto-cellulosique (il s'agit alors de protoplastes) par digestion enzymatique, puis de l'ADN, de l'ARN ou des protéines sont introduits à travers la membrane plasmique en utilisant des molécules (par exemple, le polyéthylène glycol) ou des chocs électriques qui déstabilisent transitoirement cette membrane, la rendant perméable. Dans le cas de CRISPR/Cas9, on peut y introduire directement la protéine Cas9 et l'ARN guide (Woo et al., 2015), il n'y a alors aucun ADN introduit.

- Biolistique

Des billes microscopiques d'or ou de tungstène recouvertes d'ADN ou d'ARN sont projetées à forte vitesse sur des cellules de plante *in vitro* (bombardement). Les molécules présentes sur ces billes accèdent au noyau cellulaire où elles pourront exercer leur action. Des essais de bombardement de complexes nucléo-protéiques pré-assemblés avant leur projection sont en cours.

Il est possible, après sélection, de régénérer en plantes entières les cellules transformées. Si c'est un bourgeon floral qui a été "bombardé" et non des cellules isolées, il est possible de cultiver la plante jusqu'à la production de graines et de sélectionner celles qui sont transformées.

- Whiskers

Des filaments métalliques très fins (*whiskers*) enrobés d'ADN sont mélangés énergiquement à des cellules végétales altérant la membrane de ces cellules et permettant le passage de l'ADN dans le

---

<sup>55</sup> Séquence endogène de la bactérie qui comporte les gènes responsables de la galle du collet.

cytoplasme puis le noyau. Cette technique a été utilisée pour le maïs (Kaepler et al., 1990; Petolino and Arnold, 2009), le riz (Terakawa et al., 2005), certaines plantes fourragères et plantes de gazon comme l'agrostide (Asano et al., 1991), mais elle reste peu utilisée.

#### **2.4. Méthodes de sélection des cellules et plantes modifiées et de suppression des transgènes de sélection**

Les méthodes de modification génétique sont souvent peu efficaces, et la plupart des cellules produites ne sont pas modifiées. Il est donc nécessaire d'utiliser des **méthodes de sélection des cellules modifiées**. Celles-ci peuvent se faire par utilisation d'un agent chimique sélectif (qui permet l'élimination des cellules non transformées) ou par criblage des cellules, tissus ou plantes par détection moléculaire (PCR, par exemple). Les gènes de sélection sont des gènes de résistance à un agent sélectif (herbicide, antibiotique), des gènes de sélection métaboliques (utilisation du mannose comme sucre par exemple - gène PMI<sup>56</sup>), ou des marqueurs révélés par colorimétrie (GUS<sup>57</sup> ou GFP<sup>58</sup>) (Breyer et al., 2014).

Pour éviter le maintien d'un gène de sélection dans le produit fini, il peut ensuite être supprimé (Gleave et al., 1999; Yau and Stewart, 2013) par différentes stratégies comme : la ségrégation négative du marqueur par croisements ; l'excision du marqueur par le système Cre/Lox ou R/RS de *Zygosaccharomyces rouxii* (de rares cas de maintien d'ADN excisé sous forme d'épisome dans la génération suivante ont été rapportés (Srivastava and Ow, 2003)). Ces stratégies font donc souvent appel à la transgénèse (suivi de ségrégation « négative » pour éliminer le transgène).

#### **2.5. Régénération d'une plante entière<sup>59</sup>**

Si la transformation est réalisée sur des cellules en culture, une plante entière doit être régénérée. Cependant, à l'heure actuelle, le passage de la culture cellulaire à la régénération de plante entière n'a été mis au point que sur un petit nombre d'espèces cultivées. De plus, ce passage provoque parfois des variations génétiques, épigénétiques et phénotypiques (reposant sur des bases génétiques et épigénétiques) appelées variation somaclonale (Anderson et al., 2016; Jiang et al., 2011; Kaepler et al., 2000; Wei et al., 2016), non liées à la modification recherchée.

---

<sup>56</sup> PMI : Phosphomannose isomérase

<sup>57</sup> GUS :  $\beta$ -glucuronidase, permet une coloration en présence du substrat adapté.

<sup>58</sup> GFP : Green Fluorescent Protein, protéine qui fluoresce lorsqu'elle est excitée à une longueur d'onde donnée.

<sup>59</sup> Cette étape n'est pas réglementairement soumise à évaluation lorsqu'elle est réalisée dans le cadre de la propagation clonale. La variation somaclonale peut aussi permettre de produire de nouvelles variétés. Les quelques variétés commerciales issues de variation somaclonale (Chawla, 2009) ne sont pas considérées comme provenant d'une mutagenèse induite au titre de la directive 2001/18/CE.

Si des variations génotypiques induites sont indésirables, parce qu'elles sont associées à un phénotype non voulu, il est possible de les éliminer de la plante sélectionnée par rétrocroisement avec la variété d'origine ou, de sélectionner celles qui en sont indemnes après régénération.

## **2.6. Transformation transitoire ou stable des plantes**

Les différents modes de vectorisation des composants nécessaires aux SDN (effecteurs) ainsi que leurs caractéristiques chimiques (ADN, ARN ou protéine) déterminent leur caractère stable ou transitoire. Si un ou plusieurs composants nécessaires à la réalisation des SDN est présent sous une forme stable, héréditaire, la plante est transgénique. Pour éviter la production d'un OGM, l'absence de composants ou de partie de composants, dans la plante obtenue, devra donc être démontrée et documentée. Les produits/plantes intermédiaires formés lors de la mise en œuvre de la technique seraient à distinguer des produits/plantes finis obtenus à la fin du processus.

### **2.6.1. SDN**

Dans la mise en œuvre des techniques relevant des SDN1, 2 et 3, il est important de distinguer la modification recherchée de l'ADN, celle-ci étant stable dans le génome au cours des générations, de l'apport des composants nécessaires à la réalisation de la modification ; ceux-ci sont introduits transitoirement dans la cellule de la plante sous forme d'ADN, d'ARN ou de protéine (par exemple, pour CRISPR/ Cas9 sous forme d'ARN dit guide).

L'introduction de ces composants peut se faire par :

- introduction transitoire de protéine : l'introduction des effecteurs sous la forme de protéines conduit à une présence courte de celles-ci dans la cellule, et ne rentre pas dans le cadre du transfert d'acide nucléique.
- « **Transgénèse transitoire** » : introduction d'un fragment d'ADN ou ARN qui ne s'intégrera pas dans le génome et ne sera pas transmis. Cette stratégie conduit à une présence transitoire des « gènes codant les effecteurs » dans un organisme intermédiaire. Tout comme pour l'introduction des effecteurs sous la forme d'une protéine, cette transgénèse transitoire conduit à une présence courte d'ARN et protéines effectrices dans la cellule ( de l'ordre de quelques heures) et ne rentre pas dans le cadre du transfert d'acide nucléique (Liang et al., 2015).
- **Transgénèse d'un auto-réplicon** : introduction d'un fragment d'ADN ou ARN qui se réplique sous une forme non intégrée. Cela correspond par exemple à des séquences virales (ARN ou ADN) capables de réplication, qui peuvent être utilisées pour l'amplification et l'expression de l'ARN guide du CRISPR (VIGE, Virus Induced Genome Editing) (Ali et al., 2015; Baltés et al., 2014; Čermák et al., 2015; Yin et al., 2015). Si certains virus qui pourraient être utilisés pour introduire les effecteurs sont transmissibles par les graines (Kil et al., 2016), la majorité ne le sont pas et il est facile de s'assurer que la descendance ne porte pas la séquence virale.
- **Transgénèse avec intégration puis élimination éventuelle** : intégration du fragment d'ADN dans le génome par transgénèse stable. Le transgène peut ensuite être éliminé par deux techniques : par croisement (ségrégation négative), ou par excision (voir 2.4). Dans le cadre de l'utilisation de CRISPR, il existe une possibilité

d'auto-excision, consistant en une construction qui inclut un ARN guide supplémentaire induisant l'élimination du transgène (Schaeffer and Nakata, 2015).

### **2.6.2. RdDM**

On distingue plusieurs techniques d'obtention d'ARN double brin régulateur :

- **Transgénèse transitoire** : introduction d'un fragment qui ne s'intégrera pas dans le génome et ne se répliquera pas de façon autonome. Cela conduit à la présence transitoire de transgène dans un organisme intermédiaire. La méthylation induite peut être stable sur plusieurs générations.
- **Transgénèse d'un auto-réplicon** : introduction d'un fragment d'ADN ou ARN qui se réplique sous une forme non intégrée. Ce cas correspond par exemple à des séquences virales (ADN ou ARN) capables d'auto-réplication et est appelé VIGS (virus-induced gene silencing) (Martín-Hernández and Baulcombe, 2008; Peele et al., 2001).
- **Transgénèse intégrée et ségrégation négative** : intégration du fragment d'ADN dans le génome (transgénèse). Le transgène peut être éliminé par croisement ou excision.

## **2.7. Relation entre les modifications des séquences d'ADN et le phénotype**

La question des conséquences des modifications génétiques en termes de phénotype est importante. Il n'est pas souhaitable que la modification d'une séquence entraîne des altérations non voulues de la plante dont la consommation ou la culture présenteraient alors des risques. De façon importante, le CS note néanmoins, dans ce contexte :

- Que les modifications génétiques qui seront introduites dans les plantes cultivées seront majoritairement des modifications de séquences connues ou existantes mais non décrites sur le plan moléculaire. Les modifications apportées auront pour objectif de reproduire une variation associée à un phénotype d'intérêt agronomique. Le CS indique que les modifications dont les effets sont nouveaux<sup>60</sup> (par nouvelle fonction de gène, par exemple) seront réalisées en laboratoire avant toute culture. Une utilisation agronomique d'une telle variation devra faire l'objet d'une étude au cas par cas.
- Qu'il est possible d'observer des modifications de phénotype par des mutations de séquences non codantes, fonctionnelles. Les séquences qui seront utilisées sont donc identifiées et caractérisées. C'est une condition préalable pour que leur modification dans le cadre de l'amélioration variétale soit envisagée.

---

<sup>60</sup> Voir définition nouveauté en 1.3.

### 3. Les méthodes d'analyse et de traçabilité des produits et plantes issus des techniques étudiées (point n°1 de la saisine)

*Dans cette partie le CS a discuté de la présence ou de l'absence des effecteurs en cas de SDN, de la différence entre le produit fini sans effecteur et le produit intermédiaire qui aurait exprimé transitoirement des effecteurs.*

#### 3.1. Contextualisation

##### 3.1.1. Le contexte réglementaire

###### **OGM à usage confiné**

Tant qu'elles n'ont pas vocation à sortir de confinement et à être mises sur le marché, les plantes génétiquement modifiées ne sont pas tracées au sens de la directive 2001/18/CE. Toutefois, en France, elles sont soumises à déclaration dans le cadre de l'utilisation confinée d'OGM<sup>61</sup> qui prévoit une traçabilité au laboratoire dans un registre des OGM. Ainsi, si des plantes cultivées en confinement devaient être utilisées pour l'obtention de plantes mises sur le marché, une « généalogie » complète de la variété pourra être fournie.

###### **OGM disséminé**

Actuellement, la traçabilité des OGM et de leurs dérivés est soumise au règlement (CE) n°1830/2003. Celui-ci impose le suivi des semences génétiquement modifiées par transgénèse qui donneront les produits destinés à la transformation alimentaire ou industrielle, des denrées et aliments pour animaux contenant ou consistant en OGM, des produits obtenus à partir d'OGM destinés à l'alimentation humaine ou animale, y compris les additifs et les arômes. Pour tous ces produits et tout au long de leurs filières, les opérateurs doivent informer par écrit leurs clients de la présence d'OGM, ce qui leur permet de mettre en œuvre l'étiquetage adapté.

En France des contrôles sont effectués par la DGCCRF<sup>62</sup> chaque année selon des plans de prélèvements d'échantillons sur lesquels des analyses sont effectuées pour éventuellement détecter, identifier et quantifier les OGM, et ainsi vérifier la conformité de l'étiquetage. De même la DGAI<sup>63</sup> organise un plan de surveillance annuel des semences.

Pour mettre en œuvre ces contrôles, les autorités compétentes utilisent des outils moléculaires et des méthodes que le CS a souhaité expliciter.

---

<sup>61</sup> Déclaration régulée par extension du cadre de la directive 2009/41/CE.

<sup>62</sup> Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (ministère en charge de l'Économie).

<sup>63</sup> Direction générale de l'alimentation (ministère en charge de l'Agriculture)

### 3.1.2. Définitions

Le CS rappelle ce qu'il entend par détection et traçabilité des plantes, et produits issus de plantes obtenues à l'aide des nouvelles techniques de sélection végétale (NPBT).

- **Détection** : capacité à confirmer la présence d'une entité produite par NPBT dans un échantillon donné. La précision de l'information sur la nature et la quantité de l'entité présente dépend de l'approche utilisée, de la méthodologie de détection employée et du niveau de connaissance disponible sur cette entité. Pour chaque technique utilisée, il existe une valeur seuil en dessous de laquelle la détection est impossible. Cette valeur seuil n'est pas figée, elle peut s'abaisser avec les améliorations propres à chaque technique de détection.
- **Les limites de la détection** d'une modification connue dépendent de la technique NPBT mise en œuvre et sont liées aux limites techniques des méthodes employées pour la détection. La détection est rendue encore plus difficile par dilution dans le cas de mélange.
- **Détection par screening** : capacité à affirmer la présence d'éléments génétiques révélant l'existence, dans l'échantillon, d'une entité produite par NPBT, sans permettre nécessairement son identification précise.

Les éléments génétiques recherchés peuvent être révélateurs d'une partie de la séquence de la modification ou de la technique employée pour la générer. Pour les OGM, il s'agit principalement des éléments génétiques constitutifs des cassettes de transformation utilisées. Dans certains cas, les éléments détectés peuvent permettre de suspecter la présence d'un OGM connu dont l'identité devra être vérifiée par un test spécifique d'identification. La détection par screening peut permettre de révéler la présence d'évènements de transformation partiellement ou totalement non déclarés<sup>64</sup>.

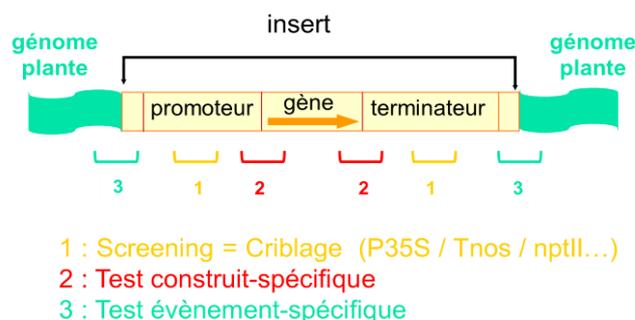
- **Identification** : capacité à affirmer qu'une entité produite par NPBT donnée est présente dans l'échantillon analysé.

Pour les OGM, elles reposent sur la détection de fragments de jonction entre les éléments génétiques constitutifs des cassettes de transformation utilisées (tests de détection construit-spécifiques) ou entre l'insert et le génome végétal environnant (tests de détection évènement-spécifiques).

- **Les limites de l'identification** d'une modification ou d'une technique inconnues dépendent de la technique NPBT mise en œuvre et sont en particulier liées aux possibilités de variation génomique naturelle (se reporter au 1.4).

---

<sup>64</sup> Du fait que le nombre de séquences des transgènes est « relativement » limitée actuellement.



**Figure 2** : Cibles potentielles pour la détection et l'identification d'OGM par amplification PCR. Les oligonucléotides utilisés pour la PCR sont indiqués en-dessous. Dans le cadre des NPBT, cette stratégie de détection peut servir pour les cas de SDN3, intragenèse et cisgenèse (pour ce dernier, oligonucléotides de type 1 et 3).

- **Quantification** : capacité à mesurer, dans l'échantillon, la quantité présente d'une entité produite par NPBT donnée, par rapport à la quantité génomique totale de l'espèce à laquelle elle appartient. Pour les OGM, cette quantification est nécessaire pour l'application de la réglementation en matière d'étiquetage (imposé en cas de dépassement du seuil de présence accidentelle autorisée, règlement CE/1829/2003).
- **Traçabilité** : capacité à retracer l'historique, la localisation et les utilisations d'une entité produite par NPBT au moyen de documents d'identification enregistrés. Les systèmes de traçabilité respectent des normes nationales et internationales (ISO 9000-2005, ISO 9001-2008, ISO 22000, NF ISO 22004, ISO 22005-2007) et sont destinés à être les plus homogènes possibles au sein des filières. Ils reposent sur une documentation standardisée qui doit être conservée pendant une période donnée (généralement 5 ans au minimum). Au sein de l'UE, la traçabilité des OGM repose sur la définition d'un identifiant unique pour chaque évènement autorisé ce qui permet d'assurer le suivi de toutes ses utilisations (« de la fourche à la fourchette ») tout au long de sa mise en marché (règlements CE/1830/2003 et CE/65/2004).

Ces notions sont abordées pour les OGM dans l'avis du HCB sur la coexistence du 17 janvier 2012<sup>65</sup>.

### 3.1.3. Démarche suivie par le CS

Tout d'abord, le CS souhaite rappeler brièvement les méthodes génétiques et phénotypiques disponibles pour assurer la détection des OGM. Ces méthodes serviront de base à la réflexion menée ci-après sur la détection de plantes et produits issus des NPBT, mais de nouvelles approches pourraient être développées.

Le CS a abordé la question des méthodes de détection et d'identification basées sur les modifications non intentionnelles induites par certaines techniques NPBT lors des étapes de **vectorisation et de**

<sup>65</sup> <http://www.hautconseil-des-biotechnologies.fr/fr/avis/avis-sur-coexistence-definition-conditions-techniques-relatives-a-mise-culture-recolte-stockage>

**variation somaclonale.** Ces vectorisations sont utilisées pour les méthodes de transgénèse classique et certaines des NPBT (voir 2.3) mais pas dans les méthodes classiques de sélection de variation naturelle ou de plantes issues de mutagénèse.

Le CS a discuté de la **détection des effecteurs** utilisés pour certaines des NPBT, tout en rappelant que ces effecteurs doivent être éliminés des plantes avant toute mise sur le marché ; si tel n'est pas le cas la plante pourrait être considérée comme transgénique du fait de l'intégration de séquences exogènes.

Le cas de chaque type de NPBT est analysé dans des fiches correspondantes (Annexe VII). Des tableaux récapitulatifs, en fin de chapitre, sont suivis de la liste des informations biologiques que le CS estimerait nécessaires pour faciliter la traçabilité d'une plante/produit issu de NPBT.

La détection, l'identification et la traçabilité des plantes/produits y sont abordées sous l'angle des trois questions suivantes :

- La modification est-elle détectable dans les plantes et leurs produits si elle est documentée ?
- Peut-on identifier la technique ayant donné lieu à cette modification dans la plante et ses produits en l'absence de documentation ?
- Si une détection est possible, est-elle applicable dans le cadre d'une recherche de présence fortuite en situation de mélange plus ou moins complexe au cours du processus de production, de transformation et de distribution ?

### **3.2. Détection des plantes et produits issus d'OGM**

Sur le marché, les OGM et leurs dérivés doivent pouvoir être détectés et identifiés, ceci afin de pouvoir assurer leur traçabilité tout au long de la chaîne agro-alimentaire. À cette fin, une méthode d'identification, développée par le notifiant et qui doit être validée, est requise lors du dépôt du dossier de demande d'autorisation de tout nouvel événement de transformation génétique en Europe.

Les cibles de détection des OGM peuvent être soit les séquences d'ADN transgéniques insérées dans le génome, soit les ARNs transcrits à partir de ces séquences soit des protéines issues de la traduction des ARNs, soit des métabolites issus du métabolisme. Les métabolites peuvent être détectés par des méthodes d'analyses biochimiques spécifiques (ex : acide laurique chez le colza ou le beta-carotène chez le riz). Les protéines recombinantes peuvent être détectées par des tests enzymatiques (dégradation d'herbicides par exemple) ou des tests immunologiques (ELISA ou strip tests). Les séquences d'acides nucléiques transgéniques peuvent être détectées par PCR qualitative, PCR quantitative en temps réel, Southern et northern blots, hybridation sur des puces à ADN et séquençage de première, seconde (NGS : *Next Generation Sequencing*) et troisième génération. Des approches de multiplexage sont possibles pour la détection simultanée de plusieurs cibles avec les différentes techniques de PCR et de séquençage (ex : ligation-mediated PCR (Holck et al., 2009)).

Afin d'optimiser les étapes de *screening*, des systèmes de détection par PCR utilisant des *pre-spotted plates* (plaques pré-spottées, PSP) ont également été développés en association avec des systèmes d'aide à la décision comme par exemple, celui du *Joint Research Center* (JRC) pour détecter tous les

OGM autorisés en Europe en une seule PCR (Rosa et al., 2016), ou celui combinant des données de traçabilité et d'analyses (Bohanec et al., 2017).

Au contraire des autres méthodes, la détection des séquences d'ADN transgéniques n'est pas affectée par le niveau d'expression des transgènes qui peut varier en fonction des tissus ou organes considérés, du stade de développement de la plante, du fond génétique ou de l'environnement. En revanche elle peut être affectée par la part de la composante génétique de l'ADN portant le transgène dans l'organe de la plante considérée (comme le nombre de copie du transgène) : par exemple dans la graine d'une plante non transgénique fécondée par une plante transgénique (voir avis coexistence<sup>66</sup>).

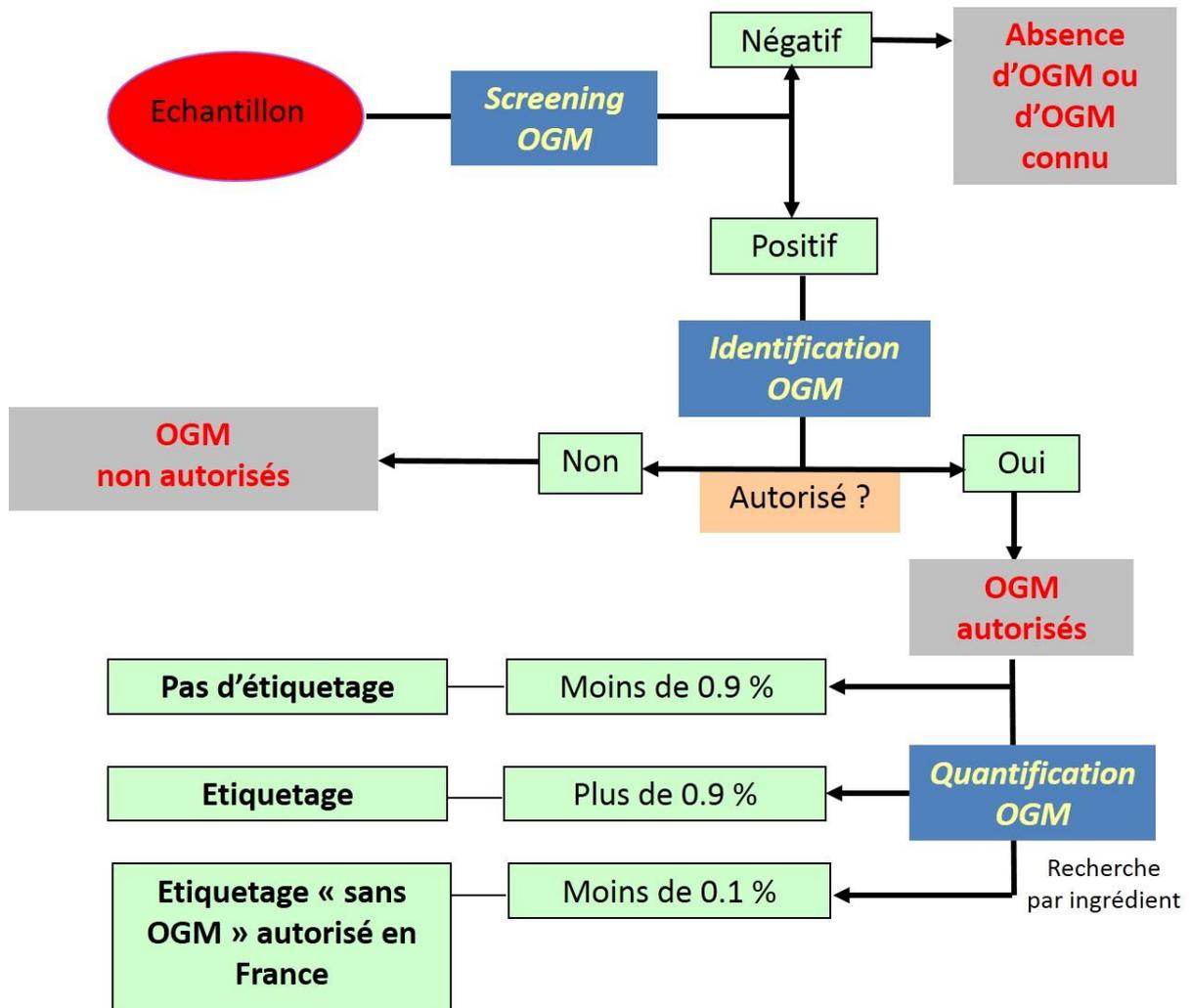
La détection d'OGM non-autorisés repose sur des approches de screening et nécessite de prouver que les éléments génétiques détectés ne proviennent ni d'OGM autorisés, ni de sources non OGM (virus et microorganismes du sol, ...), ce qui peut parfois être assez compliqué. La facilité d'identification dépend du niveau de connaissance disponible sur les séquences des transgènes recherchés. Elle est facilitée si des informations sont disponibles (par exemple, dans le cas d'un évènement évalué mais non autorisé en Europe, ou pour un évènement non-autorisé en Europe qui contiendrait une construction génétique proche d'un autre évènement autorisé produit par le même obtenteur). Dans le cas de plantes entières, les raisons pour lesquelles l'échantillon est soupçonné de contenir un OGM (phénotype, résistances impliquant certains types de gènes) sont également des indications permettant d'orienter l'identification. À l'inverse, si peu d'informations sont accessibles, l'identification peut nécessiter de laborieuses étapes de clonage et de séquençage, ce qui n'est pas actuellement envisageable en routine mais seulement dans des cas exceptionnels tels que des litiges.

La détection d'OGM inconnus pour lesquels aucune information n'est disponible, que ce soit au niveau de la séquence ou de la protéine recombinante produite, repose également sur du screening, mais celui-ci ne permet pas de détecter des OGM ne contenant que des éléments génétiques non encore décrits dans les bases de données des laboratoires d'analyses. Pour des questions de sensibilité, la quantité de matériel génétique présente dans l'échantillon analysé peut influencer sur les capacités de détection.

Les approches basées sur une comparaison à l'aveugle de données *omiques* (séquençage de génomes complets, données transcriptomiques et protéomiques) entre l'échantillon étudié et son équivalent non modifiés font l'objet d'études (Holst-Jensen et al., 2016) et semblent encore difficiles à envisager en routine. Les développements technologiques permettent en effet une réduction progressive des coûts et du temps de production de ces types de données mais ne lèvent pas les difficultés liées au temps et aux compétences requises pour leur analyse bioinformatique, ainsi que celles liées à l'existence de génomes de référence ou à la variabilité induite chez les plantes par l'environnement et la physiologie sur les niveaux d'expression des gènes.

---

<sup>66</sup> <http://www.hautconseildesbiotechnologies.fr/fr/avis/avis-sur-coexistence-definition-conditions-techniques-relatives-a-mise-culture-recolte-stockage>



**Figure 3 :** Procédure d'analyse d'un échantillon pour la recherche d'OGM et conséquences sur l'étiquetage. Un échantillon est dit négatif pour la présence d'OGM en dessous du seuil de détection dépendant de la technique utilisée pour la détection, et est dit positif si ce seuil est dépassé. Les seuils de 0.9 % et 0.1% inscrits dans la figure correspondent à la réglementation française des OGM.

### 3.3. Détection de la technique de vectorisation

Dans le cas d'une modification génétique déclarée, la détection peut se faire sur la modification elle-même. Cependant, outre la modification cible, les méthodes utilisées pour produire la transformation génétique (vectorisation, transformation, sélection) peuvent parfois laisser des traces qui sont susceptibles d'être utilisées pour la détection.

#### 3.3.1. Agrobactéries

La bactérie *Agrobacterium* est souvent utilisée pour l'introduction des composants du SDN, de la cisgène, l'intragenèse, les ségréants négatifs et la RdDM. Le CS a discuté de la persistance possible de petits fragments d'ADN issus d'*Agrobacterium* dans la zone ciblée (Brunaud et al., 2002) ou ailleurs dans le génome (Schouten and Jacobsen, 2007).

Selon la taille des fragments ils pourraient être détectés par Southern blot (>50 ou 100 pb, en fonction de la taille du génome etc.) ou par PCR (> 20 pb). Dans le cas de petits fragments (< 20 pb) une analyse de séquence par séquençage NGS permettrait, dans certaines limites, de les identifier.

Le nombre de ces fragments peut être drastiquement réduit lors des croisements avec une plante non transgénique si ces fragments ne sont pas liés génétiquement au(x) gène(s) impliqué(s) dans le(s) caractère(s) sélectionné(s). Si le CS s'accorde donc sur l'existence possible de ces fragments, il conclut cependant que leur utilisation pour l'identification ou la traçabilité de plantes est difficile et aléatoire. Par contre, si une insertion de tels fragments était documentée, ils seraient détectables facilement. Une fois identifiés dans une variété, ils pourraient être tracés.

De même, le CS a discuté de la possible persistance de certaines agrobactéries sur une à deux générations sur les plantes transformées. Les agrobactéries sont naturellement associées aux plantes. Le CS s'est accordé pour dire que la présence d'agrobactéries avec un plasmide Ti modifié ne permettrait pas dans tous les cas de détecter des plantes génétiquement modifiées. En effet ces bactéries sont généralement en grande partie éliminées par des traitements antibiotiques au laboratoire une fois l'étape de transformation réalisée et leur présence est très faible voire nulle après une ou deux générations de plantes. Elles seront très certainement absentes dans les semences qui seraient commercialisées. Des agrobactéries naturelles non modifiées pourraient éventuellement être détectées, ce signal ne serait pas une preuve du caractère transgénique de la plante puisque que cette bactérie est naturellement présente dans le sol. Le CS conclut que la présence d'agrobactéries avec un plasmide Ti modifié ne permettrait pas de qualifier les plantes comme génétiquement modifiées.

### **3.3.2. Transformation directe (transformation de protoplastes, biolistique etc.)**

Ces techniques de transformation directe ne sont pas détectables sur la plante obtenue. Par contre la détection de fragments de vecteurs insérés est identique à celle utilisée dans le cas d'*Agrobacterium*.

Une publication montre que chez les protoplastes de plantes transfectées avec un plasmide codant la nucléase et l'ARN guide, on observait, dans 0,06% à 0,14% des cas, de petites insertions d'ADN du plasmide au site de coupure (Kim and Kim, 2016). Cependant, vu l'aspect aléatoire de l'insertion et la rareté de ces événements, et compte tenu du fait que ces plantes ne seraient certainement pas sélectionnées par les obtenteurs, ces événements ne pourront pas être utilisés pour une détection.

### **3.3.3. Virus**

Dans le cas où un réplicon viral est utilisé pour l'expression de composants de modifications (par exemple un virus à ARN ou ADN pour l'expression du guide dans la technique SDN- CRISPR (Yin et al., 2015), sa détection, s'il persiste, pourrait constituer une preuve de la technique utilisée.

### **3.4. Détection des effecteurs<sup>67</sup>**

Si les effecteurs des techniques SDN et RdDM ne sont pas éliminés, la plante finale relève alors nécessairement de la réglementation OGM. La détection des effecteurs est donc une étape essentielle (voir section 7). Ces méthodes de détection sont aussi utiles dans le cadre de programmes de surveillance, en particulier pour les techniques de SDN1, 2 et 3.

La détection des effecteurs peut être réalisée par PCR ou RT-PCR<sup>68</sup>, si les séquences des effecteurs sont disponibles (déclaration ou base de données répertoriant l'ensemble des séquences de nucléases et ARN guides utilisés). Certains effecteurs sont utilisés fréquemment, comme la Cas9 et son tracrARN, différentes méganucléases et nucléases de type TALEN et ZFN. Des parties conservées de ces séquences devraient pouvoir être utilisées, en tenant compte des modifications de codons selon les espèces. L'utilisation de mélanges d'amorces pourra permettre d'identifier des effecteurs bien que partiellement modifiés (tronqués ou mutés). Cette question de la détection des effecteurs devra être revue en fonction des évolutions technologiques. Il est essentiel de pouvoir détecter des effecteurs qui persisteraient, dans le cas d'une vectorisation d'ADN non transitoire par exemple.

### **3.5. Synthèse sur la détection des plantes et produits issus des NPBT**

#### **3.5.1. Un document d'accompagnement favorisant la détection, l'identification et la traçabilité des NPBT**

Le CS s'accorde sur une liste d'informations biologiques nécessaires pour faciliter la traçabilité d'une plante/produit issu de NPBT. Dans la suite du document, la **traçabilité documentaire** fait référence à cette liste (cette liste ne serait pas obligatoirement à reprendre *in extenso* sur l'étiquetage éventuel) :

Document d'accompagnement d'un produit issu de NPBT :

Informations biologiquement nécessaires pour la traçabilité :

- Espèce et variété ;
- Méthode d'obtention ;
- Méthode de vectorisation (si applicable) ;
- Tissus ciblés par la modification ;
- Caractère(s) modifié(s) ou introduit(s) ;
- Méthode de phénotypage ;
- Séquence des zones ciblées (avant et après modification) et localisation chromosomique ;
- Présence ou absence des effecteurs nécessaires à la mise en œuvre des SDN (si applicable) ;
- Identifiant unique, selon la norme, si possible.

#### **3.5.2. Tableaux récapitulatifs**

---

<sup>67</sup> Voir la définition d'effecteur donnée en introduction.

<sup>68</sup> RT-PCR : transcription inverse des ARN suivie d'une PCR.

Tableau 1 : synthèse, par technique, des possibilités de détection et d'identification de la méthode d'obtention

<b>Techniques</b> <b>Questions</b>	SDN1 produit fini (c'est-à-dire sans effecteurs) (Mutation site-spécifique)	SDN2 produit fini (c'est-à-dire sans effecteurs) (Conversion allélique)	SDN3 (Insertion de séquence)	ODM (Mutagenèse dirigée par oligonucléotide)
<b>Détection de la modification de l'ADN<sup>69</sup></b>	Oui	Oui	Oui	Oui
<b>Insertion stable d'ADN étranger</b>	Non	Non	Oui	Non
<b>Identification de la méthode d'obtention</b>	Non	Non car assimilable à un variant naturel. Possible si la modification est combinée à une « signature moléculaire <sup>70</sup> ».	Oui sauf s'il existe un équivalent naturel. Parfois possible si combinée à une « signature moléculaire <sup>70</sup> ».	Non : cas général. Possible : si la modification est combinée à une « signature moléculaire <sup>70</sup> ».
<b>Possibilité d'obtention par une technique listée dans l'Annexe 1B de la directive 2001/18/CE</b>	Oui	Oui	Non, sauf en cas de modification pouvant avoir lieu naturellement	Oui
<b>Coexistence au champ : détection</b>	Oui <sup>71</sup> et si phénotype ou caractère absent de la zone de culture.	Oui <sup>71</sup> et si signature moléculaire ou si phénotype ou caractère absent de la zone de culture.	Oui <sup>71</sup> : cas des OGM	Oui <sup>71</sup> et si phénotype ou caractère absent de la zone de culture.

<sup>69</sup> L'identification de la modification génétique dans le génome des organismes n'est pas indicative de la méthode d'obtention.

<sup>70</sup> Une signature moléculaire consisterait en l'introduction de plusieurs nucléotides définis et dont l'association aurait une probabilité faible. Ainsi, il serait possible d'attribuer la mutation apportée à une technique et non à la simple sélection d'un variant naturel.

<sup>71</sup> Oui, si transfert de la modification, point variant selon le mode de pollinisation de la plante.

<b>Techniques</b> <b>Questions</b>	<b>Greffon non modifié sur pied SDN1, 2 ou ODM</b>	<b>Greffon non modifié sur pied SDN3 ou transgénèse</b>	<b>Greffon modifié (SDN1, 2, 3, ODM, cis et intragénèse) sur pied non modifié</b>
<b>Détection de la modification de l'ADN</b>	Oui pour le pied. Non pour le greffon et les fruits.	Oui pour le pied. Non pour le greffon et les fruits.	Possible pour le greffon. Se reporter aux techniques de modification (tableau page précédente)
<b>Insertion stable d'ADN recombinant</b>	Non	Oui pour le pied	Possible : SDN3, cisgénèse et intragénèse.
<b>Identification de la méthode d'obtention</b>	Non pour toute la plante, sauf pour le pied si signature moléculaire.	Possible pour le pied <sup>72</sup> . Non : Pour le greffon et les fruits.	Voir tableau précédent.
<b>Possibilité d'obtention par une technique listée dans l'Annexe 1B de la directive 2001/18/CE</b>	Oui	Non, sauf certaines cisgénèses.	Voir le tableau précédent pour chaque technique.
<b>Coexistence au champ : détection</b>	Oui pour la partie transgénique soumise à autorisation	Oui pour la partie transgénique soumise à autorisation	Voir le tableau précédent pour chaque technique.

<sup>72</sup> Voir le tableau des SDN3 pour des cas particuliers de difficulté de détection.

<b>Questions</b> / <b>Techniques</b>	<b>RdDM</b> (Méthylation ciblée de l'ADN)	<b>Agroinfiltration</b>	<b>Cisgenèse</b> (Introduction d'ADN d'une espèce sexuellement compatible)	<b>Intragenèse</b> (Introduction d'ADN recombinant d'une espèce sexuellement compatible)
<b>Détection de la modification de l'ADN.</b>	Oui et <b>techniquement complexe.</b>	Oui	Oui	Oui
<b>Insertion stable d'ADN recombinant</b>	Selon la technique	Non	Oui	Oui
<b>Identification de la méthode d'obtention</b>	Oui si transgenèse. Non si ARN, CRISPR.	Oui, transitoirement	Oui si transgenèse par Agrobacterium Non dans le cas de modifications génétiques pouvant avoir lieu naturellement.	Oui
<b>Possibilité d'obtention par une technique listée dans l'Annexe 1B de la directive 2001/18/CE</b>	Oui	Non, mais question non pertinente : en majorité expression transitoire.	Possible dans certains cas	Non
<b>Coexistence au champ : détection</b>	Héritabilité peu stable et dont la contribution au profil des gamètes est variable selon la plante.	Non pertinent car utilisation en milieu confiné.	Transfert selon le mode de pollinisation de la plante.	Transfert selon le mode de pollinisation de la plante.

### 3.5.3. Conclusions

Dans la majorité des cas, si les informations concernant la modification sont disponibles, il sera alors possible d'identifier les plantes et les produits des plantes issus de NPBT. Toutefois on ne pourra pas toujours, surtout sans élément de contexte, affirmer que la modification observée est bien le résultat de l'utilisation d'une NPBT et non celui d'une modification naturelle sélectionnée, voire obtenue par une autre technique : la pratique de contrôles sans données de traçabilité risque d'être associée à un grand nombre de « faux positifs ». Un échantillon est dit « négatif » pour la présence de plante obtenue par une NPBT en dessous du seuil de détection dépendant de la technique utilisée pour la détection, et est dit « positif » si ce seuil est dépassé.

Enfin, dans certains cas (pour les ségréants négatifs ou certaines greffes en particulier), même à l'aide d'informations moléculaires de traçabilité, il ne sera pas possible d'identifier les produits de plantes issues de NPBT.

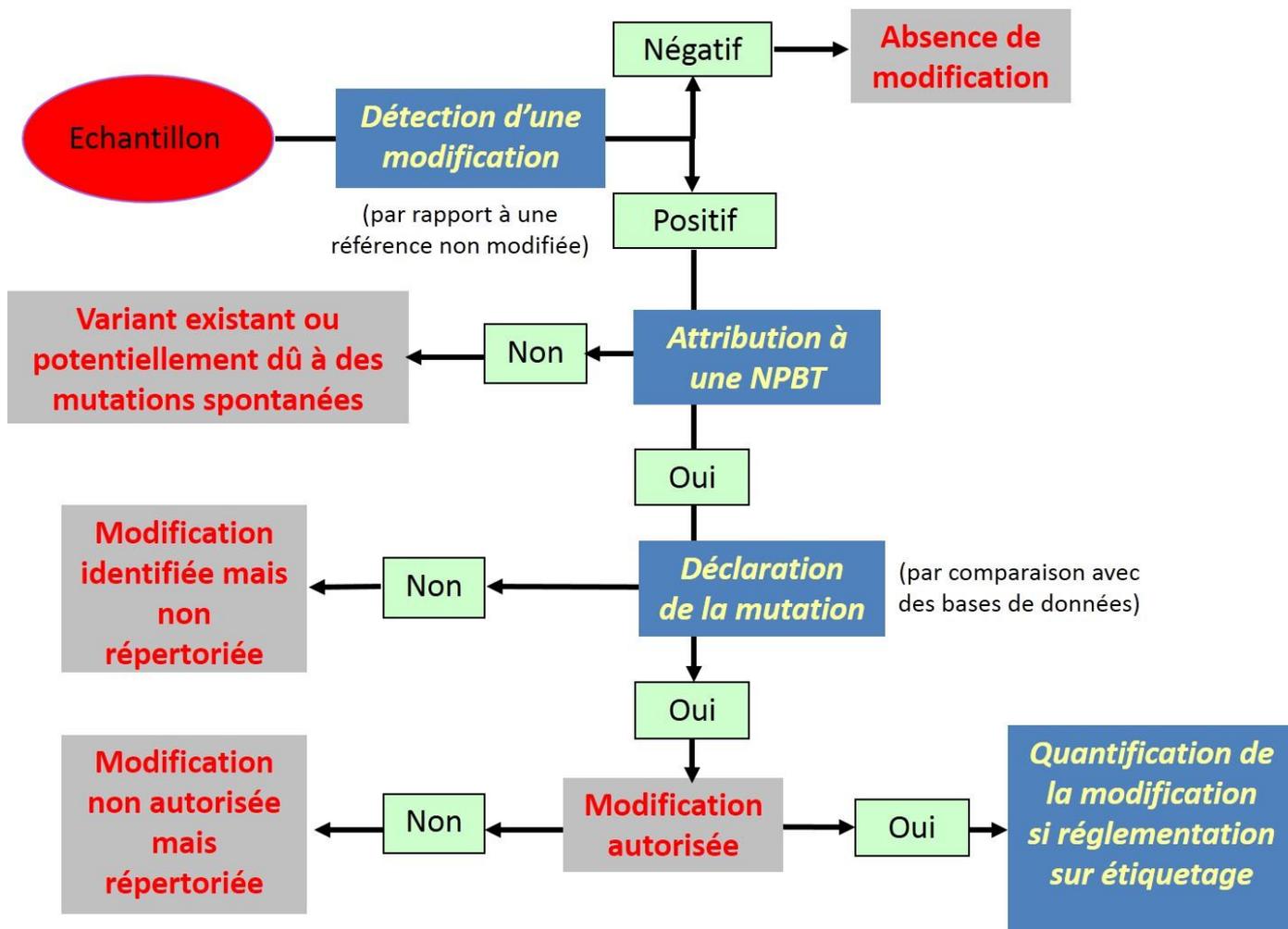


Figure 4 : Procédure potentielle d'analyse d'un échantillon pour la recherche d'une modification induite par une NPBT.

## 4. Les enjeux pour la coexistence des filières (point n°2 de la saisine en lien avec le point précédent)

*Dans cette partie les points suivants ont été discutés lors des séances de travail du CS : à propos de la définition des filières et de leur coexistence, il a été discuté de l'aspect commercial et non environnemental (à la différence de la coexistence entre OGM et environnement) de la question.*

La coexistence vise à permettre aux acteurs des différentes filières (agricoles, semencières, agro-alimentaire) de garantir, en parallèle les unes des autres, le respect de règles propres à sa filière. Sachant qu'à ce jour, la coexistence vise en France trois types de productions<sup>73</sup> :

- contenant des OGM (plus de 0,9%),
- ne contenant pas d'OGM (moins de 0,9%),
- sans OGM (moins de 0,1% ou moins de 0,9% en France) dont la filière « bio ».

L'objectif n'est pas de protéger l'environnement ou la santé, dans la mesure où les plantes autorisées auront été préalablement évaluées, mais d'organiser la production de telle sorte que les filières qui ne voudraient pas utiliser de NPBT/de produits de NPBT puissent le faire.

### 4.1. Produit final versus modalité d'obtention des plantes

**Pour les filières qui ne s'intéressent qu'au produit final** lorsque i) les variétés sont issues de NPBT<sup>74</sup> dont les produits procèderaient de la diversité génétique de l'espèce ou d'espèces proches<sup>75</sup>, et ii) dans la mesure où les propriétés de ces plantes seraient indiscernables de celles qui auraient pu être obtenues par croisements ou par d'autres techniques exemptées, il n'y a pas lieu de se poser la question de la coexistence puisqu'il ne peut y avoir de distinction.

Pour les variétés issues de NPBT qui ne pourraient pas avoir été sélectionnées dans la diversité génétique de l'espèce ou d'espèces proches<sup>76</sup>, la question de la coexistence peut se poser.

Il est à noter que certaines filières ne s'intéressent qu'au produit final tout en excluant certains caractères, comme la tolérance aux herbicides ou des *Caractères Nouveaux*, pourront imposer un cahier des charges propre. Si ces filières sont officiellement reconnues, des mesures spécifiques pourront être proposées.

**Pour les filières qui s'intéressent aux modalités d'obtention des variétés**, s'il n'est pas toujours possible de détecter ou d'identifier une modification, il est cependant possible de la tracer de manière documentaire. Là encore, ces filières devront définir leur cahier des charges. Pour ce qui est du risque de présence fortuite de la modification une obligation de moyens peut être envisagée (contrôle des repousses, distances d'isolement, zones tampons, détournement, filières ségréguées pour la

---

<sup>73</sup> (CE 1830/2003 (EC, 2003) et Décret n° 2012-128 du 30 janvier 2012 relatif à l'étiquetage des denrées alimentaires issues de filières qualifiées « sans organismes génétiquement modifiés ») ( voir figure 3).

<sup>74</sup> Techniques SDN1, SDN2, RdDM et dans certains cas intragenèse et cisgenèse.

<sup>75</sup> Espèces proches sexuellement compatibles avec lesquelles les croisements sont possibles.

<sup>76</sup> Voir note précédente.

production de semences...) alors qu'une obligation de résultats peut s'avérer difficilement applicable faute de moyens de détection utilisables en routine.

#### ***4.2. Cas où la directive 2001/18/CE serait interprétée comme excluant de son champ d'application les plantes issues de certaines NPBT***

Dans le cas où la directive 2001/18/CE serait interprétée comme excluant de son champ d'application les plantes issues de certaines de NPBT il n'existerait pas à l'heure actuelle de filière spécifique les regroupant. Chaque filière pourra cependant définir son cahier des charges dans les limites des techniques de traçabilité (incluant la traçabilité documentaire) sans impacter la réglementation.

#### ***4.3. Cas où la directive 2001/18/CE serait interprétée comme incluant dans son champ d'application les plantes issues de certaines NPBT***

Dans le cas où la Commission européenne inclurait dans la directive 2001/18/CE les plantes issues de certaines de ces techniques ou créerait une nouvelle réglementation intermédiaire spécifique, la question de la détection deviendrait primordiale. Il convient alors de distinguer le cas où la modification est déclarée, de celui où elle ne l'est pas. La situation est aussi différente suivant qu'il s'agit de détecter des modifications génétiques dans une culture en France ou s'il s'agit d'un lot d'importation. Enfin, la situation dépendra du type de NPBT mis en œuvre.

**Si la modification est identifiée (par une description moléculaire par exemple),** la détection de la modification est possible, bien que pas systématiquement attribuable à une technique, pour certaines NPBT comme les SDN, ODM, intragenèse et cisgenèse, très difficile pour RdDM et greffe sur OGM (le plus souvent) et pratiquement impossible pour les ségrégants négatifs.

**Si la modification est connue dans les banques de données,** la détection de la modification est possible, pour les techniques de modification du génome (mutation, méthylation) ainsi que pour les ségrégants négatifs et greffes si une méthode de détection a été développée en particulier par le séquençage à haut débit. Mais il sera parfois impossible de dire si la modification observée a bien été obtenue par l'utilisation d'une NPBT.

**Si les modifications génétiques et phénotypiques sont inconnues dans les banques de données,** les limites techniques énoncées précédemment rendraient plus difficile, voire pour certaines de ces techniques pratiquement impossible, la détection d'une éventuelle présence, fortuite ou non, dans une filière sans « NPBT » de produits issus de NPBT. Comme cela a été fait pour les OGM actuels (Holst-Jensen et al., 2012; Petrillo et al., 2015), le développement de méthodes et de banques de données adéquates pour la détection apparaît donc comme une condition de mise en œuvre de filières séparées avec étiquetage correspondant.

Le CS note toutefois que le seuil de présence des produits modifiés et leur type va influencer sur les possibilités de détection, celle-ci devenant impossible dans bien des cas.

## 5. Les risques directs pour la santé et l'environnement liés aux caractéristiques nouvelles des produits obtenus (point n°3 de la saisine)

*Le CS a discuté de l'intégration des 20 dernières années de culture et consommation d'OGM et a discuté de la question des impacts sur les microbiotes humains, animaux et environnementaux. De plus, le CS s'est posé la question, pour chacun des risques identifiés, s'ils étaient directs et liés aux caractéristiques nouvelles des produits. La définition des modifications hors-cible a été clarifiée. La possibilité et les éventuelles conséquences d'une rémanence non détectable d'effecteurs actifs ont été discutés.*

Le CS du HCB traitera ici des risques prévisibles, les risques de développement<sup>77</sup> ne pouvant être traités ici car ils sont imprévisibles par définition. Dans le futur, on peut penser que l'évolution des connaissances scientifiques et techniques permettra de faire évoluer la connaissance des risques et les mesures de gestion à prendre en conséquence. Le risque est la résultante d'un danger identifié (ou dommage) et de l'exposition à ce danger (probabilité de réalisation du dommage).

Selon la directive 2001/18/CE (Annexe II) et le règlement (CE) n° 1829/2003, l'évaluation des caractéristiques potentiellement nuisibles associées à une plante génétiquement modifiée s'effectue de manière relative aux caractéristiques d'une plante équivalente non génétiquement modifiée, utilisée comme comparateur. La pertinence biologique de différences statistiquement significatives permet de formuler des hypothèses de risques qui sont testées dans un second temps.

- Concernant l'évaluation des risques sanitaires associés à une plante génétiquement modifiée destinée à des fins alimentaires, la pertinence biologique d'une différence entre la plante génétiquement modifiée et son équivalent non génétiquement modifié est déterminée par la comparaison à un lot de variétés de référence non génétiquement modifiées possédant un historique d'utilisation sûre pour la santé.
- Concernant l'évaluation des risques pour l'environnement, la démarche d'évaluation comparative reste recommandée mais, du fait que la notion d'historique d'utilisation sûre ne s'applique pas aux effets de l'agriculture sur l'environnement, les limites d'équivalence ne sont pas définies par les limites de variation mais par des « *limits of concern* <sup>78</sup> ». En d'autres termes, toute caractéristique de la plante génétiquement modifiée dont la mesure sortirait des objectifs de protection environnementale fera l'objet d'une évaluation de risques approfondie. Une difficulté récurrente réside dans la définition de ces objectifs.

L'évaluation de l'exposition repose quant à elle sur l'estimation anticipée de l'étendue de la mise en culture de la variété et de la consommation des produits qui en seront issus. Ce paramètre dépend principalement de l'adoption par les agriculteurs de la/les variété(s) modifiée(s)<sup>79</sup>. Cette adoption, souvent difficile à anticiper, varie en fonction de nombreux paramètres économiques et sociaux, de

---

<sup>77</sup> Le risque de développement est défini comme un risque non connu au moment du lancement d'un produit et qui se révèle du fait du développement ultérieur des connaissances scientifiques et techniques dans le temps.

<sup>78</sup> Ce terme désigne les limites au-delà desquelles une caractéristique donnée sera d'une ampleur suffisante pour causer un préjudice pour l'environnement (d'après l'EFSA, 2010). Il est associé à la définition d'objectifs de protection environnementale.

<sup>79</sup> Le CS précise que l'exposition est liée au caractère et non à la variété ainsi si un caractère identique est présent dans plusieurs variétés différentes c'est l'adoption de l'ensemble de ces variétés qui doit être prise en compte.

l'incidence climatique mais aussi de la stratégie des différents acteurs des filières (Bonny, 2008). Ceci est vrai pour toutes les activités agricoles, qu'elles incluent ou non l'utilisation de variétés génétiquement modifiées.

D'après la directive 2001/18/CE (annexe II), **les risques directs** se réfèrent aux effets primaires sur la santé humaine ou sur l'environnement qui sont le résultat de la culture de l'OGM lui-même et qui ne sont pas dus à un enchaînement d'événements. **Les risques indirects** se réfèrent aux effets sur la santé humaine ou sur l'environnement dus à un enchaînement d'événements, par le biais de mécanismes tels que les interactions avec d'autres organismes, le transfert de matériel génétique ou des modifications dans l'utilisation ou la gestion<sup>80</sup>.

Les « caractéristiques nouvelles des produits obtenus » peuvent être de deux ordres : celles découlant directement des caractères recherchés et celles découlant des effets non intentionnels des techniques utilisées pour obtenir ces caractères.

Les points à prendre en considération sont :

- la vectorisation (quand elle intervient) ;
- le fait que les modifications sont dirigées (directionnalité génétique) ;
- la possibilité de réaliser plusieurs modifications à la fois (multiplexage).

Outre le produit obtenu, le processus de modification génétique doit donc être pris en compte dans l'analyse des risques, et ceci à deux titres :

- les risques liés à la technique de modification, par exemple la nouveauté par rapport à la sélection classique que constitue la vectorisation d'acides nucléiques ou de protéines dans les cellules de plante ;
- l'efficacité bien plus grande permise par ces techniques pour générer des variétés possédant un à plusieurs caractères valorisables sur le plan agronomique pourrait, en lien avec l'accélération du processus d'innovation auquel l'agriculture sera confrontée (l'adoption de l'innovation n'étant pas directement liée à l'utilisation des NPBT mais à de nombreux facteurs socio-économiques), conduire à une offre ou un choix variétal plus divers<sup>81</sup> et potentiellement à une adoption large par les agriculteurs, donc à une exposition importante.

Le CS du HCB indique que les risques ne sont pas exclusifs les uns des autres.

Le CS du HCB tient à préciser que si la saisine concerne les risques directs liés aux caractéristiques nouvelles des produits obtenus, il a identifié un certain nombre de risques indirects ou non liés à ces caractéristiques nouvelles. Comme toute activité humaine, l'agriculture et la mise sur le marché de variétés présentent des risques. De tels risques s'appliquent aussi bien aux NPBT qu'aux variétés obtenues par des procédés traditionnels (croisements), par des procédés réglementés (transgénèse) ou par des procédés non réglementés (mutagénèse induite). Ces risques non spécifiques et/ou

---

<sup>80</sup> Par exemple, la toxicité, l'effet de la plante sur des organismes non cibles ou sur les micro-organismes du sol seraient des risques directs. Les risques indirects seraient par exemple, l'apparition de tolérance à une toxine ou l'apparition de plantes résistantes à un herbicide par sélection ou par transfert de gène.

<sup>81</sup> Introduction dans plus de variétés de précocités différentes et /ou introduction du même caractère dans plusieurs espèces présentes dans les rotations.

indirects sont listés en annexe V. Le CS note également que les caractères introduits le seraient du fait de leur intérêt agronomique, qu'il est donc important de considérer dans l'évaluation.

### **5.1. Les risques découlant des caractères recherchés**

Le CS souligne les trois points suivants :

- L'utilisation de nouvelles techniques ne signifie pas systématiquement l'obtention de nouveaux caractères en tant que tels<sup>82</sup> (non-nouveauté exclusive). L'intérêt des SDN1, 2 et ODM est en particulier lié à la possibilité d'introduire un allèle caractérisé d'une variété dans une autre en peu d'étapes.
- Certains caractères obtenus par ces techniques pourraient être obtenus par d'autres techniques non soumises à la réglementation des OGM (croisements de variants naturels ou mutagenèse au hasard) ou réglementées (transgénèse) : plantes résistantes à des maladies ou tolérantes à des herbicides par exemple (redondance des techniques).
- Certaines techniques nécessitent l'introduction de matériel génétique étranger, transitoirement. La persistance des effecteurs (ADN/ARN/protéines) à l'origine des modifications, et du vecteur (agrobactérie, virus...) est un risque spécifique à ces techniques (voir section 5.2). L'absence de telles molécules et vecteurs devra donc être vérifiée. Si de telles molécules persistaient, ce que le CS juge non souhaitable car techniquement évitable, une évaluation des risques liés à cette persistance devrait être réalisée.

Une fois vérifiée l'absence des effecteurs et vecteurs, les risques directs sont alors communs à toutes les techniques de modification du génome et à la sélection par croisements (se reporter à l'annexe V). L'incertitude concernant ces risques augmentera logiquement au fur et à mesure que l'on s'éloignera de la variabilité génétique intrinsèque à l'espèce et que la nouveauté du caractère sera établie.

En revanche, le CS précise que, bien que cela ne soit pas dans le mandat donné (risques directs), les modifications des pratiques agricoles ou des processus agro-alimentaires associés aux nouveaux caractères (risques indirects) devraient être évaluées au cas par cas, du fait qu'elles peuvent elles-mêmes, comme l'ensemble des activités humaines, avoir des conséquences sur l'environnement ou la santé humaine. De même, bien que cela ne soit pas dans le mandat, donné par la saisine, la question des bénéfices attendus de l'utilisation de ces techniques devrait être prise en compte par les décideurs.

---

<sup>82</sup> Voir 1.3

### **5.1.1. Risques liés à la modification de plantes cultivées non précédemment génétiquement modifiées**

Il s'agit d'un risque lié de façon générale à l'amélioration des plantes mais qui pourrait se poser de façon éventuellement plus fréquente dans le cadre des NPBT du fait de la facilité d'utilisation de ces dernières. Le développement des NPBT, couplé à une diminution du prix de mise en œuvre (dépendant lui-même des coûts réglementaires associés), pourra conduire à la modification d'espèces qui n'ont pas fait l'objet jusqu'alors de modification par transgénèse.

Le contexte d'analyse des risques associés (état de l'art) dépendra alors des espèces et pas seulement des caractères modifiés.

On peut citer à titre d'exemple, les questions des risques liés à la dispersion, si les plantes cultivées ont des partenaires de reproduction sauvages. Ces questions des risques liés à la dispersion et au croisement avec des espèces localement présentes à l'état sauvage n'ont pas été obligatoirement prises en compte pour les espèces dans lesquelles il n'existait pas de variété transgénique. Bien que la méthode d'étude soit déjà mise en place pour d'autres espèces, elle doit être adaptée au cas par cas à chaque nouvelle espèce qui pourrait ainsi bénéficier des NPBT.

Le CS note que la capacité technique de régénérer des plantes après transformation reste une limitation forte à la modification de nouvelles espèces la méthode de régénération n'ayant été mise au point que pour un petit nombre d'espèces cultivées.

### **5.1.2. Risques liés à d'éventuels caractères nouveaux**

Le CS distingue (voir 1.3) les caractères nouveaux dans la variété ou l'espèce<sup>83</sup> des caractères qui n'existaient pas dans la nature et qui seraient obtenus par biologie de synthèse par exemple.

#### **5.1.2.1. Caractères nouveaux dans l'espèce<sup>84</sup>**

Un caractère nouveau dans l'espèce<sup>85</sup>, dans le cadre de cette réflexion, est un caractère qui n'existe pas dans les variétés actuellement commercialisables (et donc inscrites au catalogue européen) dans la même espèce, alors que ce caractère peut exister au sein de la diversité génétique de l'espèce. Un caractère nouveau pouvant être sélectionné par des méthodes classiques de sélection, par mutagenèse induite ou par transgénèse, le CS du HCB estime que les techniques d'édition des

---

<sup>83</sup> La directive canadienne 94-08 différencie dans cette nouveauté la nouveauté qualitative (le caractère nouveau n'existe pas dans les populations stables et en culture de l'espèce végétale) de la nouveauté quantitative (le caractère de l'espèce végétale est tout à fait en dehors de la gamme de ce caractère dans les populations stables et en culture de l'espèce végétale).

<sup>84</sup> Voir 1.3 pour les définitions de nouveauté.

<sup>85</sup> il doit être différencié du caractère nouveau en général cf 1.3.

génomomes ou de modifications épigénétiques en particulier permettent l'émergence plus rapide de caractères nouveaux dans les variétés, bien que ce risque ne soit pas spécifique aux NPBT.

Parmi les nouveaux caractères en cours de développement on peut citer (Ricroch and Hénard-Damave, 2015) :

- la résistance aux stress biotiques : nouvelles résistances à des pathogènes ou des insectes, nouvelles résistances à des herbicides ;
- la tolérance aux stress abiotiques : sécheresse, salinité, ennoisement ;
- l'efficacité d'utilisation des éléments fertilisants du sol ;
- la qualité nutritionnelle : diminution de la teneur en composés anti-nutritionnels, augmentation de la teneur en nutriments tels que vitamines, minéraux, acides gras,
- la production de molécules thérapeutiques.

Ou encore :

- des substituts à la pétrochimie ;
- la phytoremédiation.

Dans le cas de la cisgenèse et de l'intragenèse, le fait que le transgène provienne d'une variété ou d'une espèce sexuellement compatible ne dispense pas de considérations sur la qualité, la toxicité de la plante (comme pour les Solanacées : tomates et pommes de terre par exemple). Cependant ces risques sont de nature équivalente à ceux qui résultent de l'introgression du gène souhaité depuis la plante sauvage vers une plante cultivée par croisement, comme cela se pratique actuellement en sélection classique.

On peut également mentionner des risques potentiels liés à l'acclimatation d'espèces à des environnements où elles ne peuvent pousser naturellement (salinité, sécheresse, sols contaminés) ce qui pourrait conduire à leur adoption dans des nouveaux espaces. Comme toute nouvelle pratique agricole, ces impacts devront alors être évalués et/ou suivis au cas par cas par les pouvoirs publics.

D'éventuels caractères nouveaux pour les variétés cultivées pourront émerger en conséquence, entre autres, de l'accumulation de connaissances en génomique fonctionnelle. Dans le cadre de la recherche fondamentale ou appliquée, les technologies d'édition des génomes devraient elles-mêmes permettre d'accélérer l'acquisition des connaissances en génomique fonctionnelle au laboratoire, en particulier pour les caractères multigéniques (Liu et al., 2016).

#### **5.1.2.2. Caractère Nouveau (biologie de synthèse)<sup>86</sup>**

La fonction que n'exerçait le gène ni dans la variété ni dans l'ensemble des espèces proches et obtenues par évolution moléculaire devra faire l'objet d'une étude spécifique (voir partie 7.)

---

<sup>86</sup> Voir 1.3 pour la définition.

## 5.2. Risques dus aux effets non intentionnels inhérents aux nouvelles techniques

### 5.2.1. Effets indésirables liés à la persistance de l'effecteur

Plusieurs des techniques mentionnées nécessitent l'obtention de plantes intermédiaires dans lesquelles des effecteurs provenant d'autres espèces ont été introduits. Les techniques permettant de générer des modifications de type SDN1, 2 et 3 utilisent des nucléases, et possiblement des ARN guides (cas des systèmes CRISPR/Cas9). On note que :

- la persistance de l'expression de la nucléase peut entraîner des modifications hors-cibles en nombre plus important (Yee, 2016) ;
- la persistance seule des ARN guides ne semble pas associée à des risques spécifiques ;
- la persistance conjointe d'une nucléase (par exemple Cas9) et des ARN guides peut entraîner des modifications hors-cibles en nombre plus important ;
- de plus, le croisement de plantes qui contiendraient ces effecteurs (par exemple une plante contenant de la Cas9 avec une plante contenant un RNA guide) peut entraîner des modifications génétiques dans la plante-fille ;
- enfin, dans le cas particulier où la séquence reconnue par l'ARN guide correspondrait à la zone où serait inséré, de manière stable, un transgène codant la nucléase et l'ARN guide, il pourrait y avoir forçage génétique (*gene drive*). Ainsi, un forçage génétique est très hautement improbable s'il n'est pas spécifiquement recherché. Le forçage génétique est donc une transgénèse de type particulier<sup>87</sup>, et doit être évalué comme telle. Le forçage génétique est exclu de cette réflexion.

Ainsi, la propagation dans l'environnement de plantes "intermédiaires" exprimant un transgène de type nucléase, n'est ni nécessaire ni souhaitable pour la mise en œuvre de la technique qui peut se faire en milieu confiné<sup>88</sup>. Si un effecteur persistait sous forme ADN, la plante obtenue répondrait à la définition d'un OGM et devrait être soumise à autorisation dans le cadre de la directive 2001/18/CE. Le CS considère, de plus, que la persistance des effecteurs n'est pas souhaitable, et que les pétitionnaires devront s'assurer que les plantes commercialisées en sont exemptes.

**Par conséquent, le CS insiste pour que l'absence des effecteurs, sous forme d'ADN, d'ARN ou de protéine, soit démontrée avant une autorisation de mise sur le marché.**

De même, dans le cas de la modification de méthylation par la technique **RdDM**, les risques seraient que le transgène (stable ou non) du parent transgénique soit transmis.

Dans le cas des **agro-infiltrations**, le risque serait que la transformation soit transmise de manière stable par les descendants de la plante dans l'environnement. Il s'agirait alors d'OGM au sens de la directive 2001/18/CE.

---

<sup>87</sup> L'hérédité du forçage génétique est particulière puisque le transgène se transmet dans une population de façon plus rapide que par héritage mendélien, cependant les régions de forçage génétique sont soumises aux mutations naturelles qui peuvent provoquer l'arrêt du forçage.

<sup>88</sup> Malgré l'absence de données établissant un effet, le CS du HCB ne peut écarter la possibilité que cette plante puisse présenter un risque pour l'environnement et la santé.

Dans le cas des **greffons non OGM sur porte greffe OGM**, l'absence de passage des transgènes ou de produits non désirés dans la partie non-OGM et ses descendants doit être vérifiée. Le porte greffe devra être évalué en tant que tel.

### **5.2.2. Risques liés aux modifications non intentionnelles du génome, modifications hors-cibles**

Le risque lié aux modifications non intentionnelles du génome n'est pas spécifique aux NPBT. Ce risque est, en effet également associé à l'introgression d'un caractère par croisement conventionnel ou l'utilisation de mutagenèse induite qui produisent des modifications qui ne sont ni recherchées ni même connues du sélectionneur. Cependant le CS du HCB a tout de même souhaité développer ce risque dans ce chapitre.

Les techniques mettant en œuvre des nucléases ciblées (SDN), des transgènes (ségréants négatifs, sélection négative des marqueurs, cisgenèse, intragenèse), OdM, RdDM et agro-infiltration, présentent un risque potentiel de modification du génome en dehors de la modification initialement recherchée. Ce même risque existe avec les plantes transgéniques ou pour d'autres méthodes non réglementées d'amélioration des plantes. Le CS traite dans cette section les modifications non souhaitées qui seraient spécifiques à certaines NPBT indépendamment des techniques connexes (vectorisation, protoplastes et régénération), et dans le suivant de modifications non souhaitées qui peuvent être partagées avec des OGM transgéniques ou des méthodes exemptées.

Dans le cas de techniques de **modification du génome ciblée à un locus (SDN, ODN, RdDM)**, des modifications « **hors-cible** » peuvent survenir. Les autres techniques de modification des génomes quant à elles ne sont pas ciblées<sup>89</sup> et, bien qu'elles induisent de nombreuses modifications aléatoires non recherchées, on ne peut pas parler de modification « hors-cible ». Dans le cas des SDN, les nucléases peuvent agir à d'autres sites du génome, particulièrement ceux dont la séquence se rapproche de celle ciblée. Pour CRISPR, on peut observer des mutations hors-cible sur des sites différant jusqu'à cinq paires de bases de l'ARN guide (Fu et al., 2013; Jinek et al., 2012; Tsai et al., 2015) et en cas de clivage à deux sites, des réarrangements du génome (Pacher et al., 2007). De tels problèmes de spécificité existent aussi avec d'autres nucléases (Hendel et al., 2015; Lin et al., 2014).

Les types de modification hors-cibles des SDN, ODM, RdDM dépendent de la technique utilisée ainsi que de la vectorisation. Les modifications sont généralement en nombre très faible comparativement aux mutations obtenues par l'utilisation de mutagènes chimiques ou de rayonnement (techniques non réglementées) et du même ordre de grandeur que les mutations qui apparaissent naturellement dans les cellules germinales des plantes.

Ces modifications hors-cibles sont principalement observées dans le cas d'une expression prolongée des nucléases (Yee, 2016) ou des déméthylases. Le CS note que les techniques évoluent vers l'utilisation de systèmes d'expression de courte durée des enzymes de modification, et combinent

---

<sup>89</sup> Les techniques d'insertion d'ADN utilisant *Agrobacterium* ne permettent pas de cibler une zone d'insertion dans le génome, les techniques utilisant des agents mutagènes chimiques ou physiques provoquent des mutations localisées de façon aléatoires dans le génome.

des nucléases dont la spécificité a été augmentée. Le risque de mutation hors-cible décroît donc régulièrement. Dans le cas particulier de CRISPR/Cas9, le taux des modifications hors-cibles dépend du dosage de la Cas9 et des ARN guides ainsi que d'un choix optimal des ARN guides (Hsu et al., 2013; Pattanayak et al., 2013). Une optimisation de ces paramètres diminue donc le risque (Peterson et al., 2016).

Il est possible de limiter les mutations hors-cible par le choix des ARN guides, mais cela nécessite que la séquence du génome de la plante soit connue. Du fait de l'importance de la variabilité génétique naturelle, les séquences de référence ne correspondent pas nécessairement à la séquence de la variété étudiée. Les séquences non codantes ne sont pas toujours précisément connues *a fortiori* si elles ne sont pas fonctionnelles. Il est donc difficile d'identifier d'éventuelles mutations hors-cible dans les séquences non fonctionnelles, qui sont sans conséquences prévisibles. La vérification par séquençage complet du génome est difficile chez les plantes cultivées, de par la taille et la richesse en séquences répétées de ces génomes.

Les mutations hors-cibles induites sont donc actuellement difficilement quantifiables précisément en routine sur les grands génomes des plantes cultivées. Les rétrocroisements au cours du processus de sélection permettent d'éliminer la majorité des mutations hors-cible (à l'exception de celles qui seraient éventuellement génétiquement liées au caractère recherché, mais celles-ci sont accessibles au séquençage). Les rétrocroisements sont cependant techniquement difficiles à mettre en œuvre pour les plantes pérennes comme les arbres fruitiers ou les plantes à propagation essentiellement végétative. Par ailleurs les mutations hors-cible ne sont pas facilement différenciées des mutations naturelles que l'on observe chez tous les êtres vivants, y compris les plantes.

La réduction des mutations hors-cible est un domaine actif de recherche. La fréquence des mutations hors-cible peut être réduite, par l'utilisation de nouvelles CRISPR/Cas9. La réduction est telle qu'il a été récemment décrit une impossibilité de les différencier de la variation naturelle dans le cadre de cellules humaines en culture (Kleinstiver et al., 2016). Ces variants de la nucléase conservent une activité spécifique proche de la nucléase d'origine (70% à 140% d'activité dans cette publication), tout en démontrant une activité hors-cible non détectée. D'autres essais chez la plante modèle *A. thaliana* donnent des résultats comparable (Peterson et al., 2016)<sup>90</sup>.

Bien que l'élimination des mutations hors-cibles soit souvent possible par rétrocroisements sur les fonds génétiques des variétés qui seront commercialisées, si le coût des méthodes devient très faible ou dans le cas des plantes pérennes comme les arbres fruitiers où les rétrocroisements sont plus difficiles à mettre en œuvre, il deviendra peut-être intéressant pour le sélectionneur de transformer directement des variétés élites sans passer par un parent donneur (le gain de temps serait considérable). Dans ce cas les possibles mutations hors-cible spécifiques du fond génétique commercialisé seraient également éliminées par rétrocroisement (sauf potentiellement pour certaines plantes pérennes ayant un temps de génération trop long). Il est possible de réaliser *a priori* une évaluation et une prédiction des mutations hors-cible, par une analyse bio-informatique des séquences présentant une certaine similitude avec la séquence de la cible. Ceci n'est cependant réalisable qu'à condition d'avoir une connaissance exhaustive du génome de la plante à modifier.

---

<sup>90</sup> Dans cet article deux translocations ont été observées sans qu'il n'ait pu être fait de lien direct avec l'utilisation de la technique.

Les mutations hors-cible ayant un effet phénotypique seront détectées lors de la mise en culture de la plante obtenue<sup>91</sup>.

Le CS a discuté de la possibilité de proposer aux obtenteurs de séquencer en laboratoire les zones identifiées du génome durant quelques années afin d'y mesurer la fréquence des mutations hors-cible lors de l'implémentation de SDN et ODM. Ceci permettrait d'obtenir plus d'information sur ces effets hors-cible et limiterait les utilisations non maîtrisées de ces techniques. Cependant il ne semble pas toujours possible à l'heure actuelle de réaliser ce relevé dans la mesure où il faudrait connaître la séquence complète de la variété cultivée et non pas uniquement de la variété modèle de l'espèce.

### **5.2.3. Risques liés à l'association de modifications ciblées**

Certaines de ces nouvelles techniques ouvrent la possibilité de modifier en une seule fois plusieurs gènes (Qi et al., 2016)). Ce multiplexage correspond à une utilisation particulière des techniques et soulève des questions spécifiques d'analyse des risques. Ainsi la mutation de tous les gènes d'une famille multigénique ou d'une voie métabolique (ingénierie métabolique) peut permettre l'émergence de *Caractères Nouveaux*<sup>92</sup>, l'expression d'effets pléiotropiques et donc poser des questions d'impacts et de risques associés à ceux-ci.

La mutation d'un ensemble de gènes pourrait entraîner des modifications d'expression d'autres gènes ou d'autres voies métaboliques, par le biais des voies de régulation (modification de boucles de contrôle, effets de « compensation »). Ces modifications pourraient ne pas être détectées lors de l'évaluation phénotypique des variétés si elles modifient par exemple la teneur en certains composés, ou la sensibilité à des pathogènes particuliers non-cibles, le phénotypage n'étant pas exhaustif.

Plusieurs caractères contrôlés chacun par la modification génétique ou épigénétique d'un locus ou par un transgène (cisgène ou transgène) peuvent être combinés dans une variété. La combinaison de plusieurs modifications génétiques et épigénétiques ne produit pas forcément la somme des modifications phénotypiques de chacune d'entre elles (phénomène d'épistasie ; (Phillips, 2008).

---

<sup>91</sup> Le CS souhaite rappeler que les risques liés aux effets liés aux modifications hors-cible chez les plantes cultivées ne sont pas de même nature en termes de conséquences que ceux qui peuvent apparaître lorsque ces techniques sont utilisées en thérapie humaine. Les mutations hors-cible chez un patient peuvent avoir un impact grave sur le fonctionnement de son organisme et donc sur sa santé, il est donc essentiel dans ce cadre de n'utiliser que des techniques avec effet hors-cible proche de 0. Le fait que le séquençage du génome humain soit possible, rapide et facile à analyser permet ce type de validation. Dans le cadre de l'amélioration des plantes, si un événement de mutation non souhaité venait à compromettre la viabilité d'une plante cette plante ne serait simplement pas retenue par le sélectionneur pour son programme d'amélioration variétale.

<sup>92</sup> Voir 1.3

### **5.3. Les risques liés à l'accélération potentielle de la création variétale découlant de la facilité de mise en œuvre technique des NPBT et de leur efficacité**

Le CS note que l'augmentation de la vitesse et de l'efficacité des procédés d'obtention mis en œuvre par certaines des NPBT introduit un nouvel élément. Cependant le CS rappelle que cette accélération potentielle sera conditionnée par la capacité à régénérer une plante entière à partir d'une cellule modifiée chez les plantes cultivées (voir annexe V) (Germana and Lambardi, 2016). Pour les espèces cultivées, ces méthodes ciblées s'affranchissent de la dynamique de l'évolution biologique basée sur la production au hasard de variants et sélection subséquente (sélection artificielle dans l'amélioration génétique des espèces domestiquées par l'homme). Ceci oriente l'obtention des caractères chez les espèces cultivées, qui est alors bien moins contrainte par des probabilités faibles de mutations spontanées et de recombinaisons dans le sens de la modification intentionnelle des caractères.

Les NPBT permettent l'intégration d'améliorations dirigées dans une variété donnée et pourront accélérer l'impact de la sélection sur les espèces cultivées en modifiant ces plantes de manière dirigée, à de nombreux sites au sein d'un gène ou de plusieurs gènes simultanément (Cambray et al., 2011; Esvelt and Wang, 2013; Woodruff and Gill, 2011) (voir multiplexage). Ces modifications dirigées, et non au hasard constituent un changement important de la dynamique de sélection. Dans la variation génétique naturelle d'une espèce, il est possible et fréquent de trouver dans une protéine donnée plusieurs mutations (polymorphismes) causant des substitutions d'acides aminés (voir section 2.1). En revanche, la probabilité qu'une mutation donnée soit trouvée en échantillonnant des populations naturelles est faible (de l'ordre de 0,01 à 0,0001 ; (Wakeley, 2009; Watterson, 1975)). Si l'on attend l'apparition au hasard de la mutation (ensuite potentiellement sélectionnable par l'homme) et si l'on peut cribler une très grande population d'un milliard d'individus, il devient probable d'observer une nouvelle mutation prédéfinie à une génération donnée. Dans une telle population, la probabilité de combinaison de deux mutations précises et indépendantes est alors quasi-nulle (mise au carré, la probabilité dans un milliard d'individus est de l'ordre de  $10^{-9}$ ). Les nouvelles techniques de mutagenèse dirigée changent les possibilités et la vitesse d'obtention de la variété car elles permettent de combiner instantanément plusieurs mutations, définies par des expériences préalables.

Ce que ces techniques NPBT ont donc en commun est de permettre d'accélérer la sélection des plantes cultivées. L'impact de cette accélération ne peut être seulement évalué au cas par cas mais doit l'être aussi globalement.

Cette accélération des dynamiques d'obtention de nouvelles variétés constitue un élément qui peut être facteur d'amélioration agronomique mais aussi de risques. Si les NPBT accélèrent l'adoption de nouvelles variétés obtenues par ces techniques et impactant les agrosystèmes, cela pourrait entraîner une difficulté supplémentaire d'adaptation pour la biodiversité et les services écosystémiques associés. De même, la mise en culture d'espèces ou variétés nouvelles dans des milieux actuellement non cultivés pourrait également modifier les caractéristiques écologiques de ces milieux. Or, la biodiversité des milieux cultivés comme non cultivés est le support de fonctions écologiques essentielles aux populations humaines, notamment les services écosystémiques de régulation environnementale et de support (MEA, 2005<sup>93</sup>). Diverses incidences peuvent être

---

<sup>93</sup> <http://www.millenniumassessment.org/fr/>

attendues sur les systèmes de production agricole et de sa transformation que ce soit en terme économique et sociologique ou écologique, selon la nature des traits modifiés et/ou les milieux d'introduction des nouvelles variétés. Devant la diversité des situations qui pourraient survenir, il serait utile, si ces nouvelles variétés intègrent des *Caractères Nouveaux*, que soit réalisé un suivi de ces innovations en termes d'impacts écologique et agro-écologique, économique et sociétal.

## **6. Mesures de gestion à mettre en place pour prévenir et limiter les risques pour la santé et l'environnement liés à l'utilisation de produits issus de ces nouvelles techniques, si de tels risques sont mis en évidence (point n°4 de la saisine, en lien avec le point 3)**

### **Évaluation**

Les mesures de gestion devront être mises en place en fonction des résultats de l'évaluation menée lorsque, sur la base des propositions en 7., l'autorité publique aura pris des dispositions à cet égard.

### **Biovigilance**

Au-delà des éventuelles mesures de surveillance spécifique, de confinement de cultures, de protection des opérateurs, qui s'avèreraient nécessaires pour prévenir ou réduire des risques connus ou fortement suspectés d'être liés à des effets non intentionnels s'exprimant dans certaines de ces nouvelles variétés végétales, des mesures de gestion pourraient être proposées. Concernant ces mesures, il pourrait être nécessaire, dans certains cas, de mettre en œuvre une procédure de biovigilance. Celle-ci suppose que ces cultures soient déclarées dans un registre parcellaire (la sécurité de ces parcelles et des agriculteurs étant par ailleurs garantie par les pouvoirs publics) du type de ce qui avait été mise en place lors des premières cultures de maïs Bt par la loi d'orientation agricole de 1999<sup>94</sup>. Ce réseau pourrait être étendu au suivi des effets non intentionnels de la mise en culture de certaines variétés nouvelles.

Une gestion territoriale, avec un déploiement progressif, dans l'espace et dans le temps, de ces nouvelles plantes, pourra être proposée afin de maîtriser le rythme de changement des agro-écosystèmes, résultant éventuellement des NPBT.

La recherche de plantes exprimant des effecteurs pourra se faire dans le cadre de la recherche d'OGM autorisés ou non.

### **Maintien d'un pool génétique exempt de modifications**

Le CS indique qu'il reste important de conserver des pools de ressources génétiques non modifiées par NPBT.

Enfin le CS rappelle que de par la complexité des questions abordées, l'évolution des connaissances permettra de mieux prendre en compte les risques et leurs conséquences.

---

<sup>94</sup> Voir glossaire pour plus d'information

## **7. Proposition de pistes intermédiaires entre les dispositions du Catalogue européen et celles de la directive 2001/18/CE, qui vous paraîtraient utiles pour encadrer l'usage de ces nouvelles techniques sur le territoire européen, intégrant votre analyse des enjeux socio-économiques (en lien avec le point 7 de la saisine)**

*Dans cette partie les modalités et la nécessité d'utilisation des mésocosmes ont été discutés lors des séances de travail du CS.*

### **7.1. Rappel des deux dispositifs considérés**

Sont d'abord rappelées ci-dessous pour comparaison les procédures d'inscription au Catalogue (7.1, sur l'exemple du catalogue français) et les procédures découlant de la directive 2001/18/CE sur les OGM (7.2).

#### **7.1.1. Inscription au Catalogue français**

Deux catalogues officiels coexistent au plan national : le Catalogue officiel français géré par le Comité Technique Permanent de la Sélection des Plantes Cultivées (CTPS) et le Catalogue européen qui est la somme des Catalogues nationaux. Les critères d'inscription au Catalogue d'un pays à un autre pouvant varier, on se réfèrera ici au Catalogue officiel français.

En France, la commercialisation de semences de variétés nécessite une autorisation. Celle-ci est donnée par la procédure d'inscription au Catalogue officiel dont l'objectif est de garantir à l'utilisateur une semence saine, loyale et marchande. Une fois la nouvelle variété créée, celle-ci doit passer par une série de tests afin de vérifier qu'elle répond aux 3 critères de distinction, homogénéité et stabilité (DHS), ainsi qu'aux critères de valeur agronomique, technologique et environnementale (VATE). Ainsi, pour certaines espèces, les analyses agronomiques portent sur le rendement et les caractéristiques de développement, les analyses technologiques peuvent porter sur la teneur en protéines ou en facteurs anti-nutritionnels et enfin les analyses environnementales peuvent porter sur la résistance à certains bioagresseurs en vue d'une moindre utilisation des produits phytosanitaires et la résistance aux stress abiotiques en vue d'une moindre utilisation des ressources (en eau, azote, phosphore, ...). Les épreuves de la VATE sont spécifiques de chaque espèce.

À titre d'exemple, pour les pois, seront évalués le rendement en graines, la teneur en protéines, les facteurs anti-trypsiques, le poids de mille grains, la résistance au froid (seulement pois d'hiver), la résistance à la verse, alors que pour le blé seront évalués, l'alternativité, la résistance au froid, la résistance à la verse et à la germination sur pied, l'aptitude au semis précoce, la résistance à certaines maladies (fusarioses, rouilles (jaune et brune), septoriose, piétin verse), le rendement, la classe de qualité technologique, les caractères technologiques...

### **7.1.2. Dispositif européen spécifique aux plantes OGM**

La directive européenne 2001/18/CE encadre la mise en culture et la mise sur le marché des plantes génétiquement modifiées (non exemptées dans l'annexe IB). Une évaluation des risques sanitaires (allergénicité, toxicité et composition nutritionnelle) et environnementaux (risques directs et indirects) est réalisée<sup>95</sup>. Elle porte sur l'événement d'insertion d'un transgène et permet l'autorisation d'importation ou de culture de plantes présentant un tel événement quel que soit le fond génétique (voir Glossaire, Annexe VI).

Ainsi, une variété issue d'une technique de sélection conventionnelle sera évaluée par le CTPS afin d'obtenir son inscription au Catalogue officiel français ; une variété issue de techniques OGM sera évaluée selon les critères définis par la directive 2001/18/CE puis par le CTPS.

## **7.2. Réflexion sur un dispositif intermédiaire**

### **7.2.1. Notion de différence/équivalence en dehors du caractère apporté**

Que ce soit l'évaluation DHS-VATE examinée par le CTPS ou celle réalisée dans le cadre de la directive 2001/18/CE, la majeure partie des évaluations sont comparatives à des variétés proches non modifiées. Or, les notions de différence ou équivalence en dehors du caractère nouveau lui-même sont toujours complexes. Quelles plantes de référence est-il le plus légitime de prendre en considération ? Quelles méthodes de mesures précises pour trancher entre différence et équivalence : analyses phénotypiques (dont analyses *omiques*<sup>96</sup>) ? Quelles gammes de variations génétiques, phénotypiques ou environnementales inclure dans ces études ?

Les analyses phénotypiques réalisées par le CTPS, bien que ne pouvant être exhaustives, ont jusqu'à ce jour démontré leur efficacité en termes de sécurité sanitaire et environnementale.

L'analyse des données *omiques* serait un moyen additionnel, dans le futur, pour trancher sur une différence ou une équivalence entre 2 variétés. Elle pourrait éventuellement permettre de mieux appréhender les risques directs et indirects inattendus. Ce domaine cependant n'est pas complètement mûr, en termes de normalisation des données, de bases de données et d'annotations, pour être actuellement utilisé comme méthode de mesure. Cela pourrait, à terme, compléter les analyses phénotypiques actuelles.

### **7.2.2. Modalités : un dispositif assis sur une appréciation au cas par cas de la nécessité d'une évaluation spécifique**

---

<sup>95</sup> En France, l'évaluation sanitaire est réalisée par l'ANSES et le HCB et l'évaluation environnementale par le HCB.

<sup>96</sup> Les analyses « omiques » intègrent des analyses que l'on peut considérer comme phénotypiques : protéome, métabolome, imagerie haut débit, ...

Le CS propose une évaluation au cas par cas en fonction du produit obtenu et des techniques utilisées pour l'obtenir en se basant sur une déclaration documentaire de l'obteneur.

Ainsi le CS propose que l'obteneur remette un document descriptif (le Vademecum) à un organisme en charge de l'évaluation. Cet organisme évaluerait ensuite les informations permettant l'identification et l'évaluation des plantes issues de NPBT. Ce Vademecum devrait être intégré au dossier d'évaluation, et permettrait dans un premier temps d'orienter l'évaluation de la modification génétique (Figure 6 *supra*).

Ce Vademecum devrait, lorsque nécessaire, apporter des informations sur les points suivants :

- espèce
- identification de l'événement et du matériel végétal avant la modification par une NPBT,
- méthode d'obtention,
- vectorisation utilisée,
- tissus ciblés par la modification,
- caractère(s) modifié(s) ou introduit(s),
- caractérisation moléculaire de l'événement,
- séquence des zones ciblées (avant et après modification) et localisation chromosomique,
- présence ou absence des composants nécessaires à la mise en œuvre des techniques (si applicable),
- analyses phénotypiques (Méthodes de phénotypage du caractère modifié ou introduit),
- impacts sanitaires et environnementaux si applicable
- toute information que l'obteneur jugerait utile d'ajouter.

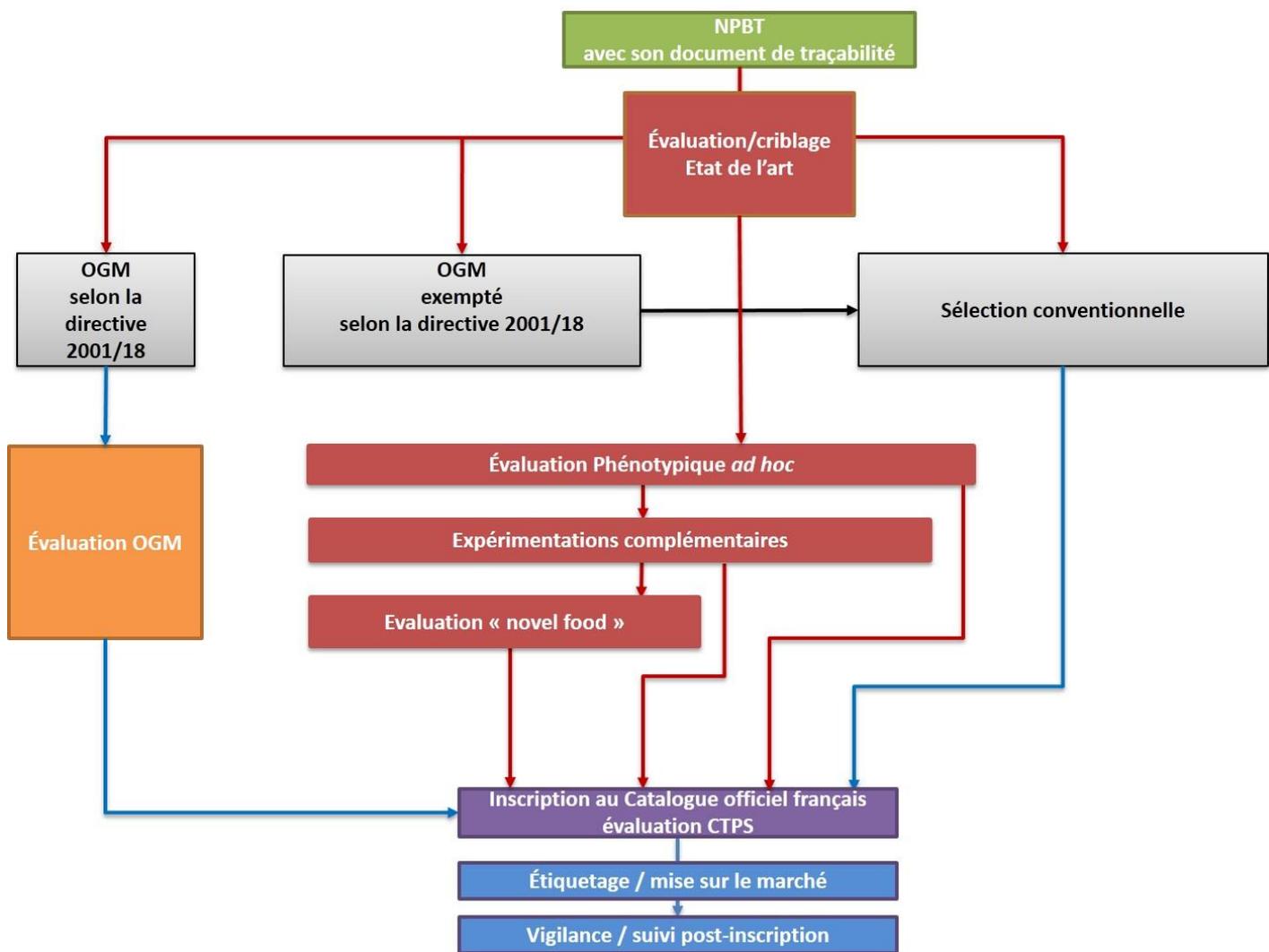
**En première étape, ce document descriptif** permettrait de classer la modification génétique selon la typologie décrite ci-dessous. C'est à ce niveau que devrait être définie notamment l'appartenance d'une plante/produit à SDN2 ou SDN3 par exemple. De plus, si les effecteurs (composants nécessaires à la réalisation de la technique) sont présents dans la plante/produit, celui-ci serait considéré *de facto* comme un OGM.

Cette évaluation reposerait également sur une analyse des connaissances du produit, de ses impacts à partir de la liste des risques identifiés (exemple : bénéfiques/risques d'une modification de la composition biochimique de la plante/organes récoltés) et des voies métaboliques impactées par la modification génétique, ce qui permettrait de mieux appréhender les effets attendus et inattendus du caractère nouveau. Ainsi, un document de type « Guidelines » à destination du déposant, donnant donc les grandes lignes directrices, devra être disponible et préciser pour chacun des cas les informations qui devront nécessairement être portées au dossier définitif.

L'organisme qui définira le statut de la modification génétique, en fonction du document de traçabilité et de l'état de l'art, se garde la possibilité d'orienter l'évaluation de la variété selon la typologie décrite.

En deuxième étape, pour les plantes/produits qui n'auraient pas été orientés sur des modes d'évaluation répondant à des réglementations existantes, cette évaluation approfondie suite au routage vers l'évaluation phénotypique (Figure 6) aurait pour objectif d'évaluer les risques directs et indirects attendus (risques sanitaires et environnementaux) (les coûts) et les bénéfices liés aux produits issus de la plante transformée et identifiés lors du routage.

Dans le cas d'un *Caractère Nouveau*<sup>97</sup> dans un produit à destination de l'alimentation humaine, ces critères pourront pour la partie concernant la toxicité et l'apport nutritionnel, se rapprocher de ceux décrits dans la réglementation *novel food* de la Commission européenne<sup>98</sup> (portant sur la toxicité du produit, et sur d'éventuels déséquilibres nutritionnels induits par son introduction dans le régime alimentaire global), critères actuellement évalués par l'ANSES. Cette évaluation sanitaire pourrait être complétée par une évaluation environnementale.



<sup>97</sup> Voir 1.3 pour la définition

<sup>98</sup> [http://ec.europa.eu/food/safety/novel\\_food/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/safety/novel_food/index_en.htm)

**Figure 6** : Propositions de pistes intermédiaires (en rouge) entre l'évaluation proposée par la directive 2001/18/CE (en gris) et l'inscription au catalogue (en violet) pour l'évaluation et la mise sur le marché des plantes obtenues par NPBT.

Dans certains cas, en troisième étape, l'organisme évaluateur pourrait demander la mise en place d'expérimentations pour préciser certains points ou des mesures d'accompagnement post-inscription.

Dans un esprit de transparence, cette évaluation aurait également pour objectif de préciser la nouveauté du caractère, afin d'informer les professionnels et la société civile. Cette nouveauté pourrait ne pas être associée à un risque mais sa connaissance pourrait impacter les choix des professionnels et de la société civile ainsi que les conditions d'exploitation de l'innovation.

Dans tous les cas, l'inscription au Catalogue préalable à la mise sur le marché suivie d'une biovigilance post-commercialisation serait nécessaire.

### **7.3. Méthodes d'évaluation proposées**

#### ***Caractères Nouveaux***

Le CS remarque qu'un certain nombre de risques potentiels listés pour les NPBT ne seraient pas différents de ceux issus de la sélection dite conventionnelle, ce qui est en faveur de la mise en place d'un même processus d'évaluation dans les deux cas. La prise en compte d'un historique d'utilisation sûre (*history of safe use*) devrait intervenir pour ajuster les évaluations demandées.

L'utilisation de mésocosmes, lorsque ceux-ci pourraient s'avérer pertinents, dans les évaluations préalables à la mise en champ pourrait être envisagée.

#### **Risques directs pour la santé humaine**

Il s'agit d'une part, de la toxicité potentielle des composés nouveaux qui seraient présents dans la plante et ses sous-produits ou de leur impact en termes d'équilibre nutritionnel, en association avec l'exposition alimentaire ; d'autre part, de possibles phénomènes allergiques suite à des expositions par voie aérienne (pollen), cutanée (chez les travailleurs notamment) et alimentaire. Ces risques sont communs à toute nouvelle variété.

La stratégie d'évaluation de la sécurité sanitaire des NPBT se doit de prendre en compte les spécificités de chacune de ces techniques.

Le « tableau récapitulatif des risques et de leurs spécificités et des méthodes d'atténuation associées (Tableau V.1) » donne, à cet égard, des pistes quant aux deux référentiels possibles :

- celui de « l'obtention classique » pour laquelle aucune exigence particulière en matière d'évaluation de la sécurité sanitaire n'est envisagée, en dehors de la réglementation sanitaire qui s'applique à l'alimentation en général ;

- celui de la « Transgénèse », pour laquelle des dispositions spécifiques sont prévues et qui recouvrent les trois volets évoqués précédemment.

Dix classes de risques potentiels, découlant d'effet non intentionnels, ont été identifiés :

- Persistance de l'effecteur, persistance du vecteur, méthode de sélection, modification non intentionnelle du génome, modifications hors-cible non intentionnelles du génome dues à la vectorisation et à la régénération, association de modifications ciblées, pléiotropie, expression d'ARN interférant, dissémination des ARN interférents, effets systémiques et multigénérationnels non intentionnels.
- Pour deux de ces classes (persistance de l'effecteur et association de modifications ciblées), seules les SDN se différencient des autres techniques et devront, en conséquence, démontrer l'absence des effecteurs.
- Pour deux autres (Persistance du vecteur, méthode de sélection), les risques ont également été identifiés pour la transgénèse et les dispositions en la matière s'appliquent à ces NPBT.
- Pour les risques d'expression et de dissémination des ARN interférents, les dispositions de la transgénèse s'appliquent aux techniques Cisgénèse/SDN3.
- Quant aux risques identifiés également avec l'obtention classique ou les mutants aléatoires (Modifications hors-cible non intentionnelles du génome dues à la vectorisation et à la régénération, pléiotropie, effets systémiques et multigénérationnels non intentionnels), et s'agissant de risques non spécifiques, il n'y aurait pas lieu, en principe, d'envisager des dispositions particulières.

En conclusion, les dispositions mises en œuvre pour statuer sur la sécurité sanitaire de NPBT doivent s'appuyer sur celles des deux bornes extrêmes que constituent, d'une part la méthode d'obtention classique et, d'autre part, celle de la transgénèse.

### **Modifications non intentionnelles**

Le CS du HCB propose, que, lorsque cela est possible, lors de l'utilisation de nucléases ciblées, les zones identifiées in silico pour avoir une séquence qui est proche de celle de la zone ciblée par la modification soient séquencées.

### **Association de modifications ciblées**

Pour les variétés concernées, des systèmes d'évaluation expérimentale spécifiques et de biovigilance pourront être mis en œuvre. Le CS préconise que lorsqu'elles apparaîtront, ces applications soient étudiées au cas par cas sachant qu'il n'existe pas d'exemple de ce type de modification à ce jour.

## Bibliographie :

- Ali, Z., Abul-faraj, A., Li, L., Ghosh, N., Piatek, M., Mahjoub, A., Aouida, M., Piatek, A., Baltes, N.J., Voytas, D.F., et al. (2015). Efficient Virus-Mediated Genome Editing in Plants Using the CRISPR/Cas9 System. *Mol. Plant* 8, 1288–1291.
- Anderson, J.E., Michno, J.-M., Kono, T.J.Y., Stec, A.O., Campbell, B.W., Curtin, S.J., and Stupar, R.M. (2016). Genomic variation and DNA repair associated with soybean transgenesis: a comparison to cultivars and mutagenized plants. *BMC Biotechnol.* 16.
- Andersson, M.S., and de Vicente, M.C. (2010). *Gene flow between crops and their wild relatives* (Johns Hopkins University Press).
- Asano, Y., Otsuki, Y., and Ugaki, M. (1991). Electroporation-mediated and silicon carbide fiber-mediated DNA delivery in *Agrostis alba* L. (Redtop). *Plant Sci.* 79, 247–252.
- Auer, C., and Frederick, R. (2009). Crop improvement using small RNAs: applications and predictive ecological risk assessments. *Trends Biotechnol.* 27, 644–651.
- Bairu, M.W., Aremu, A.O., and Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul.* 63, 147–173.
- Baltes, N.J., Gil-Humanes, J., Cermak, T., Atkins, P.A., and Voytas, D.F. (2014). DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell* 26, 151–163.
- Bechtold, N., Ellis, J., and Pelletier, G. (1993). In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus Académie Sci. Sér. 3 Sci. Vie* 316, 1194–1199.
- Bohan, D.A., Boffey, C.W., Brooks, D.R., Clark, S.J., Dewar, A.M., Firbank, L.G., Haughton, A.J., Hawes, C., Heard, M.S., May, M.J., et al. (2005). Effects on weed and invertebrate abundance and diversity of herbicide management in genetically modified herbicide-tolerant winter-sown oilseed rape. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 272, 463–474.
- Bohanec, M., Boshkoska, B.M., Prins, T.W., and Kok, E.J. (2017). SIGMO: A decision support System for Identification of genetically modified food or feed products. *Food Control* 71, 168–177.
- Bonny, S. (2008). Genetically modified glyphosate-tolerant soybean in the USA: adoption factors, impacts and prospects. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 28, 21–32.
- Bonny, S. (2016). Genetically Modified Herbicide-Tolerant Crops, Weeds, and Herbicides: Overview and Impact. *Environ. Manage.* 57, 31–48.
- Breyer, D., Kopertekh, L., and Reheul, D. (2014). Alternatives to Antibiotic Resistance Marker Genes for *In Vitro* Selection of Genetically Modified Plants – Scientific Developments, Current Use, Operational Access and Biosafety Considerations. *Crit. Rev. Plant Sci.* 33, 286–330.
- Brunaud, V., Balzergue, S., Dubreucq, B., Aubourg, S., Samson, F., Chauvin, S., Bechtold, N., Cruaud, C., DeRose, R., Pelletier, G., et al. (2002). T-DNA integration into the *Arabidopsis* genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO Rep.* 3, 1152–1157.
- van den Bulk, R.W., Löffler, H.J., Lindhout, W.H., and Koornneef, M. (1990). Somaclonal variation in tomato: effect of explant source and a comparison with chemical mutagenesis. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* 80, 817–825.
- Burdon, J.J., Barrett, L.G., Rebetzke, G., and Thrall, P.H. (2014). Guiding deployment of resistance in cereals using evolutionary principles. *Evol. Appl.* 7, 609–624.
- Cambray, G., Mutalik, V.K., and Arkin, A.P. (2011). Toward rational design of bacterial genomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 624–630.

- Cantos, C., Francisco, P., Trijatmiko, K.R., Slamet-Loedin, I., and Chadha-Mohanty, P.K. (2014). Identification of “safe harbor” loci in indica rice genome by harnessing the property of zinc-finger nucleases to induce DNA damage and repair. *Front. Plant Sci.* 5, 302.
- Castle, L.A. (2004). Discovery and Directed Evolution of a Glyphosate Tolerance Gene. *Science* 304, 1151–1154.
- Čermák, T., Baltes, N.J., Čegan, R., Zhang, Y., and Voytas, D.F. (2015). High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol.* 16.
- Chandler, C.H., Chari, S., and Dworkin, I. (2013). Does your gene need a background check? How genetic background impacts the analysis of mutations, genes, and evolution. *Trends Genet.* 29, 358–366.
- Chawla, H.S. (2009). Introduction to plant biotechnology (Enfield, NH: Science Publishers).
- Chèvre, A.M., Eber, F., Baranger, A., and Renard, M. (1997). Gene flow from transgenic crops. *Nature* 389, 924–924.
- De Vries, F.T., Bracht Jørgensen, H., Hedlund, K., and Bardgett, R.D. (2015). Disentangling plant and soil microbial controls on carbon and nitrogen loss in grassland mesocosms. *J. Ecol.* 103, 629–640.
- Dempewolf, H., Hodgins, K.A., Rummell, S.E., Ellstrand, N.C., and Rieseberg, L.H. (2012). Reproductive isolation during domestication. *Plant Cell* 24, 2710–2717.
- Devos, Y., Meihls, L.N., Kiss, J., and Hibbard, B.E. (2013). Resistance evolution to the first generation of genetically modified *Diabrotica*-active Bt-maize events by western corn rootworm: management and monitoring considerations. *Transgenic Res.* 22, 269–299.
- Dixon, D.P., McEwen, A.G., Laphorn, A.J., and Edwards, R. (2003). Forced evolution of a herbicide detoxifying glutathione transferase. *J. Biol. Chem.* 278, 23930–23935.
- EC (2003). Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. *Off. J. Eur. Union* L268, 24–28.
- EFSA (2011). Scientific Opinion on guidance on the Post-Market Environmental Monitoring (PMEM) of genetically modified plants. *EFSA J.* 9 (8): 2316, 40 pp.
- EFSA, P. on G.M.O. (GMOs) (2014). Scientific Opinion on the use of existing environmental surveillance networks to support the post-market environmental monitoring of genetically modified plants: Scientific Opinion on the use of existing ESNs to support the PMEM of GMPs. *EFSA J.* 12, 3883.
- Esvelt, K.M., and Wang, H.H. (2013). Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Mol. Syst. Biol.* 9, 641.
- Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K., and Sander, J.D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* 31, 822–826.
- Garnier, A., and Lecomte, J. (2006). Using a spatial and stage-structured invasion model to assess the spread of feral populations of transgenic oilseed rape. *Ecol. Model.* 194, 141–149.
- Garnier, A., Deville, A., and Lecomte, J. (2006). Stochastic modelling of feral plant populations with seed immigration and road verge management. *Ecol. Model.* 197, 373–382.
- Garnier, A., Pivard, S., and Lecomte, J. (2008). Measuring and modelling anthropogenic secondary seed dispersal along roadverges for feral oilseed rape. *Basic Appl. Ecol.* 9, 533–541.

Gauffreteau, A., D'Orchymond, M., Pontet, C., and Debaeke, P. (2016). Can Genotype x Environment Management Interactions (GEMI) be predicted in sunflower multi-environment trials? In Proc., (Edirne (Turkey)), p.

Gauffreteau, A., Grignon, G., Pachot, P., Lorgeou, J., Piraux, F., Maupas, F., Escriou, H., Pontet, C., and Salvi, F. (2015). Assessing the predictive accuracy of various statistical methods (PLS, random forest and factorial regression) that use environmental covariates to model genotype x environment interactions in multi-environment trials. *Biultyn Oceny Odmian* 34.

Germana, M.A., and Lambardi, M. (2016). *In vitro* embryogenesis in higher plants (New York, NY: Humana Press).

Gleave, A.P., Mitra, D.S., Mudge, S.R., and Morris, B.A. (1999). Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. *Plant Mol. Biol.* 40, 223–235.

Gouesnard, B., Chastanet, M., Tollon-Cordet, C., Dubreuil, P., Boyat, A., and Charcosset, A. (2005). Etude de la diversité génétique du maïs en Europe : analyse d'ADN ancien à partir d'échantillons d'herbier et confrontation avec l'analyse moléculaire à grande échelle de collections de populations. Genetic diversity of maize in Europe : molecular analysis of ancient DNA from herbariums and comparison with molecular analysis of a large collection of populations. In *Un Dialogue Pour La Diversité Génétique*, (Lyon, FRA Paris, FRA: Bureau des Ressources Génétiques), pp. 345–356.

Hall, M.C., Dworkin, I., Ungerer, M.C., and Purugganan, M. (2007). Genetics of microenvironmental canalization in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 13717–13722.

Hendel, A., Fine, E.J., Bao, G., and Porteus, M.H. (2015). Quantifying on- and off-target genome editing. *Trends Biotechnol.* 33, 132–140.

Heslot, N., Akdemir, D., Sorrells, M.E., and Jannink, J.-L. (2014). Integrating environmental covariates and crop modeling into the genomic selection framework to predict genotype by environment interactions. *Theor. Appl. Genet.* 127, 463–480.

Holck, A.L., Drømtorp, S.M., and Heir, E. (2009). Quantitative, multiplex ligation-dependent probe amplification for the determination of eight genetically modified maize events. *Eur. Food Res. Technol.* 230, 185–194.

Holst-Jensen, A., Bertheau, Y., de Loose, M., Grohmann, L., Hamels, S., Hougs, L., Morisset, D., Pecoraro, S., Pla, M., Van den Bulcke, M., et al. (2012). Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. *Biotechnol. Adv.* 30, 1318–1335.

Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., et al. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 31, 827–832.

Jiang, C., Mithani, A., Gan, X., Belfield, E.J., Klingler, J.P., Zhu, J.-K., Ragoussis, J., Mott, R., and Harberd, N.P. (2011). Regenerant *Arabidopsis* Lineages Display a Distinct Genome-Wide Spectrum of Mutations Conferring Variant Phenotypes. *Curr. Biol.* 21, 1385–1390.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821.

Jones, J.D.G., Witek, K., Verweij, W., Jupe, F., Cooke, D., Dorling, S., Tomlinson, L., Smoker, M., Perkins, S., and Foster, S. (2014). Elevating crop disease resistance with cloned genes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 20130087–20130087.

Kaeppler, H.F., Gu, W., Somers, D.A., Rines, H.W., and Cockburn, A.F. (1990). Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells. *Plant Cell Rep.* 9, 415–418.

- Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F., and Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.* *43*, 179–188.
- Kil, E.-J., Kim, S., Lee, Y.-J., Byun, H.-S., Park, J., Seo, H., Kim, C.-S., Shim, J.-K., Lee, J.-H., Kim, J.-K., et al. (2016). Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. *Sci. Rep.* *6*, 19013.
- Kim, J., and Kim, J.-S. (2016). Bypassing GMO regulations with CRISPR gene editing. *Nat. Biotechnol.* *34*, 1014–1015.
- Kimura, M. (1984). *The neutral theory of molecular evolution* (Cambridge University Press).
- Kole, C., Muthamilarasan, M., Henry, R., Edwards, D., Sharma, R., Abberton, M., Batley, J., Bentley, A., Blakeney, M., Bryant, J., et al. (2015). Application of genomics-assisted breeding for generation of climate resilient crops: progress and prospects. *Front. Plant Sci.* *6*, 563.
- Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., and Sadh, R.K. (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech* *6*.
- Lamichhane, J.R., Devos, Y., Beckie, H.J., Owen, M.D.K., Tillie, P., Messéan, A., and Kudsk, P. (2016). Integrated weed management systems with herbicide-tolerant crops in the European Union: lessons learnt from home and abroad. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1–17.
- Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., Lv, J., Xie, X., Chen, Y., Li, Y., et al. (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*.
- Lin, Y., Fine, E.J., Zheng, Z., Antico, C.J., Voit, R.A., Porteus, M.H., Cradick, T.J., and Bao, G. (2014). SAPTA: a new design tool for improving TALE nuclease activity. *Nucleic Acids Res.* *42*, e47.
- Liu, D., Hu, R., Palla, K.J., Tuskan, G.A., and Yang, X. (2016). Advances and perspectives on the use of CRISPR/Cas9 systems in plant genomics research. *Curr. Opin. Plant Biol.* *30*, 70–77.
- Lynch, M. (2010). Evolution of the mutation rate. *Trends Genet.* *26*, 345–352.
- Machczyńska, J., Zimny, J., and Bednarek, P.T. (2015). Tissue culture-induced genetic and epigenetic variation in triticale ( $\times$  *Triticosecale* spp. Wittmack ex A. Camus 1927) regenerants. *Plant Mol. Biol.* *89*, 279–292.
- Martín-Hernández, A.M., and Baulcombe, D.C. (2008). Tobacco rattle virus 16-kilodalton protein encodes a suppressor of RNA silencing that allows transient viral entry in meristems. *J. Virol.* *82*, 4064–4071.
- Mba, C. (2013). Induced Mutations Unleash the Potentials of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. *Agronomy* *3*, 200–231.
- McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A., and Henikoff, S. (2000). Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.* *123*, 439–442.
- Molesini, B., Pii, Y., and Pandolfini, T. (2012). Fruit improvement using intragenesis and artificial microRNA. *Trends Biotechnol.* *30*, 80–88.
- Newbold, T., Hudson, L.N., Hill, S.L.L., Contu, S., Lysenko, I., Senior, R.A., Börger, L., Bennett, D.J., Choimes, A., Collen, B., et al. (2015). Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. *Nature* *520*, 45–50.
- O’Doherty, K.C., Neufeld, J.D., Brinkman, F.S.L., Gardner, H., Guttman, D.S., and Beiko, R.G. (2014). Opinion: Conservation and stewardship of the human microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 14312–14313.

- Ong-Abdullah, M., Ordway, J.M., Jiang, N., Ooi, S.-E., Kok, S.-Y., Sarpan, N., Azimi, N., Hashim, A.T., Ishak, Z., Rosli, S.K., et al. (2015). Loss of Karma transposon methylation underlies the mantled somaclonal variant of oil palm. *Nature* *525*, 533–537.
- Ossowski, S., Schneeberger, K., Lucas-Lledo, J.I., Warthmann, N., Clark, R.M., Shaw, R.G., Weigel, D., and Lynch, M. (2010). The Rate and Molecular Spectrum of Spontaneous Mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Science* *327*, 92–94.
- Pacher, M., Schmidt-Puchta, W., and Puchta, H. (2007). Two unlinked double-strand breaks can induce reciprocal exchanges in plant genomes via homologous recombination and nonhomologous end joining. *Genetics* *175*, 21–29.
- Parry, M.A.J., Madgwick, P.J., Bayon, C., Tearall, K., Hernandez-Lopez, A., Baudo, M., Rakszegi, M., Hamada, W., Al-Yassin, A., Ouabbou, H., et al. (2009). Mutation discovery for crop improvement. *J. Exp. Bot.* *60*, 2817–2825.
- Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J.P., Ma, E., Doudna, J.A., and Liu, D.R. (2013). High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.* *31*, 839–843.
- Peele, C., Jordan, C.V., Muangsan, N., Turnage, M., Egelkrout, E., Eagle, P., Hanley-Bowdoin, L., and Robertson, D. (2001). Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *27*, 357–366.
- Peterson, B.A., Haak, D.C., Nishimura, M.T., Teixeira, P.J.P.L., James, S.R., Dangl, J.L., and Nimchuk, Z.L. (2016). Genome-Wide Assessment of Efficiency and Specificity in CRISPR/Cas9 Mediated Multiple Site Targeting in *Arabidopsis*. *PloS One* *11*, e0162169.
- Petolino, J.F., and Arnold, N.L. (2009). Whiskers-mediated maize transformation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *526*, 59–67.
- Petrillo, M., Angers-Loustau, A., Henriksson, P., Bonfini, L., Patak, A., and Kreysa, J. (2015). JRC GMO-Amplicons: a collection of nucleic acid sequences related to genetically modified organisms. *Database* *2015*, bav101.
- Phillips, P.C. (2008). Epistasis — the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nat. Rev. Genet.* *9*, 855–867.
- Qi, W., Zhu, T., Tian, Z., Li, C., Zhang, W., and Song, R. (2016). High-efficiency CRISPR/Cas9 multiplex gene editing using the glycine tRNA-processing system-based strategy in maize. *BMC Biotechnol.* *16*, 58.
- Raitskin, O., and Patron, N.J. (2016). Multi-gene engineering in plants with RNA-guided Cas9 nuclease. *Curr. Opin. Biotechnol.* *37*, 69–75.
- Ramesh, S.V. (2013). Non-coding RNAs in Crop Genetic Modification: Considerations and Predictable Environmental Risk Assessments (ERA). *Mol. Biotechnol.*
- Rao, A.G. (2008). The outlook for protein engineering in crop improvement. *Plant Physiol.* *147*, 6–12.
- Reboud, X., Gabas, S., Borgy, B., Bonneau, M., Délos, M., and Fried, G. (2013). Que nous disent les réseaux d'observatoires sur les réactions de la flore adventice aux évolutions des pratiques agricoles ? *Innov. Agron.* *28*, 127–140.
- Regnault-Roger, C. (2014). *Produits de protection des plantes innovation et sécurité pour une agriculture durable* (Paris: Tec & Doc : Lavoisier).
- Rhee, Y., Sekhon, R.S., Chopra, S., and Kaepler, S. (2010). Tissue culture-induced novel epialleles of a Myb transcription factor encoded by pericarp color1 in maize. *Genetics* *186*, 843–855.

- Ricroch, A.E., and Hénard-Damave, M.-C. (2015). Next biotech plants: new traits, crops, developers and technologies for addressing global challenges. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1–16.
- Roles, A.J., Rutter, M.T., Dworkin, I., Fenster, C.B., and Conner, J.K. (2016). Field measurements of genotype by environment interaction for fitness caused by spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 70, 1039–1050.
- Rosa, S.F., Gatto, F., Angers-Loustau, A., Petrillo, M., Kreysa, J., and Querci, M. (2016). Development and applicability of a ready-to-use PCR system for GMO screening. *Food Chem.* 201, 110–119.
- Schaeffer, S.M., and Nakata, P.A. (2015). CRISPR/Cas9-mediated genome editing and gene replacement in plants: Transitioning from lab to field. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* 240, 130–142.
- Schouten, H.J., and Jacobsen, E. (2007). Are Mutations in Genetically Modified Plants Dangerous? *J. Biomed. Biotechnol.* 2007, 1–2.
- Simpson, R.B., Spielmann, A., Margossian, L., and McKnight, T.D. (1986). A disarmed binary vector from *Agrobacterium tumefaciens* functions in *Agrobacterium rhizogenes*: Frequent co-transformation of two distinct T-DNAs. *Plant Mol. Biol.* 6, 403–415.
- Smith, D.R., Hooker, A.L., Lim, S.M., and Beckett, J.B. (1971). Disease Reaction of Thirty Sources of Cytoplasmic Male-Sterile Corn to *Helminthosporium Maydis* Race T1. *Crop Sci.* 11, 772.
- Srivastava, V., and Ow, D.W. (2003). Rare instances of Cre-mediated deletion product maintained in transgenic wheat. *Plant Mol. Biol.* 52, 661–668.
- Stelpflug, S.C., Eichten, S.R., Hermanson, P.J., Springer, N.M., and Kaeppler, S.M. (2014). Consistent and heritable alterations of DNA methylation are induced by tissue culture in maize. *Genetics* 198, 209–218.
- Stewart, R.I.A., Dossena, M., Bohan, D.A., Jeppesen, E., Kordas, R.L., Ledger, M.E., Meerhoff, M., Moss, B., Mulder, C., Shurin, J.B., et al. (2013). Mesocosm Experiments as a Tool for Ecological Climate-Change Research. In *Advances in Ecological Research*, (Elsevier), pp. 71–181.
- Stukenbrock, E.H., and McDonald, B.A. (2008). The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 75–100.
- Suprasanna, P., Mirajkar, S.J., and Bhagwat, S.G. (2015). Induced Mutations and Crop Improvement. In *Plant Biology and Biotechnology*, B. Bahadur, M. Venkat Rajam, L. Sahijram, and K.V. Krishnamurthy, eds. (New Delhi: Springer India), pp. 593–617.
- Tabashnik, B.E., Brévault, T., and Carrière, Y. (2013). Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nat. Biotechnol.* 31, 510–521.
- Tadele, Z., Mba, C., and Till, B.J. (2010). TILLING for Mutations in Model Plants and Crops. In *Molecular Techniques in Crop Improvement*, S.M. Jain, and D.S. Brar, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 307–332.
- Tatum, L.A. (1971). The Southern Corn Leaf Blight Epidemic. *Science* 171, 1113–1116.
- Terakawa, T., Hasegawa, H., and Yamaguchi, M. (2005). Efficient Whisker-mediated Gene Transformation in a Combination with Supersonic Treatment. *Breeding Science* 55, 465–468.
- Traidl-Hoffmann, C., Jakob, T., and Behrendt, H. (2009). Determinants of allergenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 558–566.
- Tsai, S.Q., Zheng, Z., Nguyen, N.T., Liebers, M., Topkar, V.V., Thapar, V., Wyvekens, N., Khayter, C., Iafrate, A.J., Le, L.P., et al. (2015). GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat. Biotechnol.* 33, 187–197.

- Ülker, B., Li, Y., Rosso, M.G., Logemann, E., Somssich, I.E., and Weisshaar, B. (2008). T-DNA-mediated transfer of *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal DNA into plants. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1015–1017.
- Vigouroux, Y., Barnaud, A., Scarcelli, N., and Thuillet, A.-C. (2011). Biodiversity, evolution and adaptation of cultivated crops. *C. R. Biol.* *334*, 450–457.
- Wakeley, J. (2009). *Coalescent theory: an introduction* (Greenwood Village, Colo: Roberts).
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., and Qiu, J.-L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat. Biotechnol.* *32*, 947–951.
- Watterson, G.A. (1975). On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor. Popul. Biol.* *7*, 256–276.
- Wei, F.-J., Kuang, L.-Y., Oung, H.-M., Cheng, S.-Y., Wu, H.-P., Huang, L.-T., Tseng, Y.-T., Chiou, W.-Y., Hsieh-Feng, V., Chung, C.-H., et al. (2016). Somaclonal variation does not preclude the use of rice transformants for genetic screening. *Plant J.* *85*, 648–659.
- Whitney, K.D., Ahern, J.R., Campbell, L.G., Albert, L.P., and King, M.S. (2010). Patterns of hybridization in plants. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* *12*, 175–182.
- Wolfarth, F., Schrader, S., Oldenburg, E., and Brunotte, J. (2016). Mycotoxin contamination and its regulation by the earthworm species *Lumbricus terrestris* in presence of other soil fauna in an agroecosystem. *Plant Soil* *402*, 331–342.
- Woo, J.W., Kim, J., Kwon, S.I., Corvalán, C., Cho, S.W., Kim, H., Kim, S.-G., Kim, S.-T., Choe, S., and Kim, J.-S. (2015). DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat. Biotechnol.* *33*, 1162–1164.
- Woodruff, L.B.A., and Gill, R.T. (2011). Engineering genomes in multiplex. *Curr. Opin. Biotechnol.* *22*, 576–583.
- Xu, P., Zhang, Y., Kang, L., Roossinck, M.J., and Mysore, K.S. (2006). Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. *Plant Physiol.* *142*, 429–440.
- Yau, Y.-Y., and Stewart, C.N. (2013). Less is more: strategies to remove marker genes from transgenic plants. *BMC Biotechnol.* *13*, 36.
- Yee, J.-K. (2016). Off-target effects of engineered nucleases. *FEBS J.* *283*, 3239–3248.
- Yin, K., Han, T., Liu, G., Chen, T., Wang, Y., Yu, A.Y.L., and Liu, Y. (2015). A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. *Sci. Rep.* *5*, 14926.
- Younis, A., Siddique, M.I., Kim, C.-K., and Lim, K.-B. (2014). RNA Interference (RNAi) Induced Gene Silencing: A Promising Approach of Hi-Tech Plant Breeding. *Int. J. Biol. Sci.* *10*, 1150–1158.
- Yuan, L., Kurek, I., English, J., and Keenan, R. (2005). Laboratory-directed protein evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *69*, 373–392.

## Annexe I Saisine



*La ministre de l'Environnement, de  
l'Énergie et de la Mer,  
chargée des relations internationales  
sur le climat*

*Le ministre de l'Agriculture, de  
l'Agroalimentaire  
et de la Forêt  
Porte-parole du Gouvernement*

Paris, le 22 février 2016

Madame la Présidente,

Les nouvelles techniques de sélection ou NBT (New Breeding Techniques) comprennent un ensemble de techniques récentes de modification du génome qui mettent en œuvre des processus tels que mutation, réplication, activation ou extinction de gènes, etc. Ces techniques visent à modifier de façon précise et ciblée une séquence génétique.

Certaines techniques ont d'ores et déjà conduit à la mise sur le marché de variétés végétales.

Le développement des NBT soulève plusieurs questions en raison des caractéristiques suivantes :

- certaines ne sont pas détectables dans le produit final obtenu, ce qui pose des interrogations quant à leur traçabilité et au contrôle de leur utilisation, notamment de leur dissémination dans l'environnement,
- elles sont généralement protégées par des brevets,
- elles ne sont pas mentionnées dans les listes de techniques qui définissent le champ de la réglementation sur les OGM et dont la rédaction est antérieure à l'apparition de ces techniques.

Madame Christine NOIVILLE  
Haut Conseil des Biotechnologies  
244 boulevard Saint-Germain  
75007 PARIS 07

De ce fait, il n'est pas aujourd'hui juridiquement établi si l'utilisation de ces techniques de sélection doit ou non respecter le cadre réglementaire tel qu'il a été conçu pour les OGM : évaluation, autorisation, traçabilité et contrôle.

La Commission européenne a, depuis 2007, commandé une série de travaux d'expertise : groupe d'experts ad hoc sur les questions techniques de définition des OGM, avis de l'AESA (Agence Européenne de Sécurité des Aliments) sur l'identification des risques sanitaires et environnementaux et la faisabilité de leur évaluation, rapport du JRC (Joint Research Center) sur les enjeux plus globaux du développement de ces techniques, et enfin une expertise encore en cours sur le plan juridique pour proposer une interprétation de la réglementation. La représentation néerlandaise a annoncé que le sujet figurerait à l'ordre du jour des travaux du Conseil dont elle assure la présidence pour le premier semestre 2016.

Le HCB a déjà rendu un rapport provisoire sur les sujets liés à l'apparition et au développement des NTB le 4 février dernier.

Suite à ce rapport, le Gouvernement dispose d'une première analyse sur les éléments suivants :

- Une synthèse des travaux déjà entrepris au sein du HCB, comprenant une description de ces techniques et des risques éventuels qu'elles présentent pour la santé et l'environnement, ainsi qu'une identification des positions des parties prenantes et des enjeux qui y sont liés.
- Un éclairage du HCB sur les caractéristiques variétales obtenues par ces techniques ;
- L'expertise du HCB sur le statut réglementaire des nouvelles techniques ;

Nous souhaitons désormais que le HCB élargisse son expertise aux éléments suivants, pour les techniques qu'il n'a pas identifiées comme susceptibles d'entrer dans le champ de la directive 2001/18/CE :

1. Méthodes d'analyse et de traçabilité des produits et plantes issus des techniques étudiées ;
2. En lien avec le point précédent, les enjeux pour la coexistence des filières ;
3. Les risques directs pour la santé et l'environnement liés aux caractéristiques nouvelles des produits obtenus ;
4. En lien avec le point 3, les mesures de gestion à mettre en place pour prévenir et limiter les risques pour la santé et l'environnement liés à l'utilisation de produits issus de ces nouvelles techniques, si de tels risques sont mis en évidence ;

5. Les impacts de ces nouvelles techniques sur les capacités d'innovation des acteurs économiques ;
6. Enjeux pour l'accès aux ressources génétiques liés à la propriété industrielle, en lien notamment avec le point 1 ;
7. L'analyse de l'interprétation juridique de la Commission européenne sur le statut réglementaire des nouvelles techniques dès lors qu'elle sera disponible ;
8. En lien avec le point 7 proposer des pistes intermédiaires entre les dispositions du catalogue européen et celles de la directive 2001/18/CE, qui vous paraîtraient utiles pour encadrer l'usage de ces nouvelles techniques sur le territoire européen, intégrant votre analyse des enjeux socio-économiques.

Ces travaux seront menés en priorité sur l'année 2016.

Nous vous prions de croire, Madame la Présidente, à l'assurance de notre considération distinguée.

  
Ségolène ROYAL

  
Stéphane LE FOLL

## Annexe II Lettre de cadrage

### Mandat des GT NPBT 2

Le HCB a été saisi le 22 février 2016 par Ségolène Royal et Stéphane Le Foll de la question des nouvelles techniques de sélection végétale (NPBT). Il lui est demandé d'élargir son expertise à 8 points, et ce « pour les techniques qu'il n'a pas identifiées comme susceptibles d'entrer dans le champ de la directive 2001/18/CE ».

En préalable, le Bureau du HCB rappelle que la directive 2001/18/CE vise les techniques qui produisent des produits classés comme OGM selon une définition qui n'a pas été actualisée depuis sa rédaction. Cette directive soumet certains de ces produits à différentes règles : évaluations, traçabilité, etc. Elle en exempte d'autres (annexe IB). La directive ayant été rédigée à une époque où les nouvelles techniques de sélection végétale (NPBT) n'existaient pas, un certain nombre de questions se posent :

- les nouvelles techniques produisent-elles des produits qualifiables « OGM » selon la définition de la directive 2001/18/CE ?
- dans l'affirmative, ces OGM doivent-ils être soumis à des exigences réglementaires (notamment d'évaluation préalable à leur culture et commercialisation) ou exemptés ?
- si des exigences réglementaires s'imposent, celles prévues par la directive 2001/18/CE sont-elles adaptées aux caractéristiques des différentes NPBT ou de leurs produits ?
- à défaut, quelles autres modalités d'évaluation seraient pertinentes ?

Si la plupart de ces questions relèvent de choix politiques qui n'incombent pas au HCB, il lui revient en revanche de fournir aux autorités compétentes les éléments scientifiques, techniques, économiques, éthiques et sociaux de nature à éclairer leurs choix.

Le Bureau du HCB souhaite rappeler ce que les deux comités ont jusqu'ici produit dans cette perspective et les modalités selon lesquelles ils devront travailler.

I.

Le Bureau du HCB a demandé au comité scientifique (CS) d'éclairer deux points :

- la qualification des produits qui sont issus de ces techniques : doivent-ils ou non être considérés comme des OGM au sens de la directive 2001/18/CE ?
- les éventuels risques environnementaux et sanitaires liés aux techniques utilisées.

Sur la première question, le CS s'est accordé sur le fait que, à l'exception de certains types de RDdM et de l'agroinfiltration utilisée pour des productions transitoires, ces techniques pourraient entrer dans le champ des techniques donnant lieu à la production d'OGM au sens de la définition de la directive 2001/18/CE.

Sur la deuxième question, le CS du HCB a précisé qu'il ne pouvait identifier de risque intrinsèque aux nouvelles techniques considérées. Les risques éventuels découleraient de l'utilisation qui pourrait être faite de ces techniques et des produits obtenus ou des pratiques associées à leurs caractéristiques. Dans cette logique, le CS a comparé, d'un point de vue biologique, les produits des NPBT avec ceux obtenus par des techniques soumises à la directive 2001/18/CE et avec ceux obtenus par des techniques qui en sont

exemptées (annexe IB). Le CS a conclu que certains produits des NPBT sont biologiquement comparables à des produits exclus du champ d'application de cette directive.

Du côté du CEES, les organisations et personnalités qualifiées ont été invitées à faire état de leurs points de vue sur la question des NPBT et de leurs impacts potentiels aux plan économique, éthique et social. Ces contributions ont été compilées et ont fait l'objet d'une synthèse. Par ailleurs, un travail d'analyse juridique a été conduit par le Secrétariat du HCB, résumant les nombreuses analyses juridiques existantes (en Europe notamment) relatives au statut des NPBT et les deux personnalités du CEES qualifiées au titre de leurs compétences en droit ont, toutes deux, produit des éléments d'analyse détaillés sur cette question.

II.

La saisine ministérielle en date du 22 février 2016 invite le HCB à élargir son expertise à une série de questions. Elle précise que ces questions concernent « les techniques qui n'ont pas été identifiées par le HCB comme susceptibles d'entrer dans le champ de la directive 2001/18 CE ». Comme rappelé plus haut, dans sa note du 4 février 2016, le CS du HCB a énoncé qu'en majorité<sup>1</sup>, les produits issus de l'utilisation de ces nouvelles techniques répondent à la définition d'OGM au sens de la directive 2001/18/CE et que certains d'entre eux sont biologiquement comparables aux produits exemptés du champ d'application de cette directive. On rappellera, par ailleurs, que c'est aux pouvoirs publics qu'il revient de trancher la question de savoir s'il faut réglementer ou non les produits issus de ces techniques et, si oui, sur le fondement de quel dispositif juridique. La saisine demande au HCB qu'il fournisse les éléments nécessaires à la construction de cette décision.

Afin de proposer la réponse la plus complète possible, le Bureau du HCB a décidé d'ouvrir cette saisine à l'ensemble des techniques qui ont déjà été traitées lors de la première phase de réflexion. De plus le Bureau souhaite que les groupes de travail discutent aussi de techniques émergentes telles que la biologie de synthèse et d'autres techniques exploitant l'épigénétique.

Cela posé, les groupes de travail du HCB s'interrogeront sur les points suivants (dont le Bureau précise ci-dessous lesquels relèvent de quel(s) comité(s)) :

1. Pour le CS et le CEES : Les méthodes d'analyse et de traçabilité des produits issus des techniques étudiées ;
2. Pour le CS et le CEES : les enjeux pour la coexistence des filières ;
3. Pour le CS : les risques directs pour la santé et l'environnement liés aux caractéristiques nouvelles des produits obtenus ;
4. Pour le CS : si de tels risques sont mis en évidence, les mesures de gestion à mettre en place pour prévenir et limiter les risques pour la santé et l'environnement liés à l'utilisation de produits issus de ces nouvelles techniques ;

---

<sup>1</sup> Sauf pour le RdDM dans certains cas ainsi que certaines utilisations de l'agroinfiltration.

5. Pour le CEES : les impacts de ces nouvelles techniques sur les capacités d'innovation des acteurs économiques ;
6. Pour le CEES : les enjeux pour l'accès aux ressources génétiques liés à la propriété industrielle, en lien notamment avec le point 1 ;
7. Le point 7 sera traité ultérieurement ;
8. Pour le CS et le CEES : proposer des pistes intermédiaires entre les dispositions du catalogue européen d'inscription des variétés et celles de la directive 2001/18/CE qui paraîtraient utiles pour encadrer l'usage de ces nouvelles techniques sur le territoire européen, intégrant l'analyse des enjeux socio-économiques.

## Annexe III Liste des membres du Groupe de Travail

Le rapport du groupe de travail a été élaboré à partir des discussions qui ont eu lieu au sein du groupe de travail du CS du HCB entre le 29 mars et le 15 juin 2016 sous la responsabilité du rapporteur du CS Marie-Bérengère Troadec.

Le groupe de travail du CS du HCB est un groupe pluridisciplinaire composé de personnalités scientifiques choisies pour leur expertise afin de répondre aux questions posées dans la saisine. Par ordre alphabétique des noms de famille, le GT du CS du HCB est composé de :

Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Cécile Collonnier, Marie-Anne Félix, Jeanne Garric, Philippe Guerche, Valérie Le Corre, Thierry Orsière, Michel Renard et Marie-Bérengère Troadec.

Le groupe de travail a auditionné deux experts externes ayant une expertise dans le domaine de l'épigénétique et des effets hors-cibles des CRISPR/Cas9 :

Vincent Colot et Jean-Paul Concordet.

Ces deux experts ont été entendus dans le cadre des travaux du groupe de travail mais n'ont pas pris part à la rédaction du rapport ni aux discussions qui ont eu lieu au sein du groupe de travail.

## **Annexe IV Liste des membres du comité scientifique**

### **Séance plénière du 13 juillet (matin)**

#### présents :

Jean-Christophe Pagès, Président, Claudine Franche, Vice-présidente, Pascal Boireau, Vice-président, et par ordre alphabétique des noms de famille :

Claude Bagnis, Bruno Chauvel, Denis Couvet, Elie Dassa, Hubert de Verneuil, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Bernard Klonjkowski, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Nadia Naffakh, Didier Nègre, Sergio Ochatt, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.

#### - absents, représentés :

Philippe Guerche, Eliane Meurs.

#### - absents, excusés :

Avner Bar Hen, Marie-Anne Barny, Philippe Berny, Yves Bertheau (démissionnaire), Thierry Brévault, Nathalie Eychenne, André Jestin, Marc Lavielle, Valérie Le Corre, Jean-Louis Noyer, Daniel Parzy.

### **Séance plénière du 13 juillet (après-midi)**

#### présents :

Jean-Christophe Pagès, Président, Pascal Boireau, Vice-président, et par ordre alphabétique des noms de famille :

Claude Bagnis, Bruno Chauvel, Denis Couvet, Elie Dassa, Hubert de Verneuil, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Didier Nègre, Sergio Ochatt, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.

#### - absents, représentés :

Claudine Franche, Philippe Guerche, Eliane Meurs.

#### - absents, excusés :

Avner Bar Hen, Marie-Anne Barny, Philippe Berny, Yves Bertheau (démissionnaire), Thierry Brévault, Nathalie Eychenne, André Jestin, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Valérie Le Corre, Nadia Naffakh, Jean-Louis Noyer, Daniel Parzy.

### **Séance plénière du 21 septembre (matin)**

#### présents :

Jean-Christophe Pagès, Président, Claudine Franche, Vice-présidente, Pascal Boireau, Vice-président, et par ordre alphabétique des noms de famille :

Claude Bagnis, Avner Bar Hen, Marie-Anne Barny, Bruno Chauvel, Denis Couvet, Elie Dassa, Hubert de Verneuil, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle,

Valérie Le Corre, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Eliane Meurs, Nadia Naffakh, Didier Nègre, Jean-Louis Noyer, Sergio Ochatt, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Jean-Luc Vilotte.

- absents, représentés :

Thierry Brévault, Philippe Guerche, Olivier Lemaire.

- absents, excusés :

Philippe Berny, Yves Bertheau (démissionnaire), Nathalie Eychenne, André Jestin, Daniel Parzy, Bernard Vaissière.

**Séance plénière du 21 septembre (après midi)**

- présents :

Jean-Christophe Pagès, Président, Claudine Franche, Vice-présidente,

et par ordre alphabétique des noms de famille :

Claude Bagnis, Marie-Anne Barny, Bruno Chauvel, Denis Couvet, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Bernard Klonjkowski, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Nadia Naffakh, Jean-Louis Noyer, Sergio Ochatt, Michel Renard, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Jean-Luc Vilotte.

- absents, représentés :

Pascal Boireau, Elie Dassa, Hubert de Verneuil, Philippe Guerche, Eliane Meurs, Catherine Regnault-Roger, Bernard Vaissière.

- absents, excusés :

Avner Bar Hen, Philippe Berny, Yves Bertheau (démissionnaire), Thierry Brévault, Nathalie Eychenne, André Jestin, Marc Lavielle, Valérie Le Corre, Didier Nègre, Daniel Parzy.

**Séance plénière du 23 novembre (matin)**

- présents :

Jean-Christophe Pagès, Président, Claudine Franche, Vice-présidente, Pascal Boireau, Vice-président et par ordre alphabétique des noms de famille :

Claude Bagnis, Marie-Anne Barny, Thierry Brévault, Denis Couvet, Hubert de Verneuil, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Valérie Le Corre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Eliane Meurs, Didier Nègre, Sergio Ochatt, Catherine Regnault-Roger, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.

- absents, représentés :

Elie Dassa, Nadia Naffakh, Michel Renard.

- absents, excusés :

Avner Bar Hen, Philippe Berny, Yves Bertheau (démissionnaire), Bruno Chauvel, Nathalie Eychenne, André Jestin, Jean-Louis Noyer, Daniel Parzy.

### **Séance plénière du 23 novembre (après-midi)**

#### - présents :

Jean-Christophe Pagès, Président, Claudine Franche, Vice-présidente

et par ordre alphabétique des noms de famille :

Claude Bagnis, Marie-Anne Barny, Thierry Brévault, Denis Couvet, Hubert de Verneuil, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Valérie Le Corre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Eliane Meurs, Didier Nègre, Sergio Ochatt, Catherine Regnault-Roger, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.

#### - absents, représentés :

Pascal Boireau, Elie Dassa, Nadia Naffakh , Michel Renard.

#### - absents, excusés :

Avner Bar Hen, Philippe Berny, Yves Bertheau (démissionnaire), Bruno Chauvel, Nathalie Eychenne, André Jestin, Jean-Louis Noyer, Daniel Parzy.

### **Séance plénière du 15 décembre (matin)**

#### - présents :

Jean-Christophe Pagès, Président, Claudine Franche, Vice-présidente, Pascal Boireau, Vice-président

et par ordre alphabétique des noms de famille :

Claude Bagnis, Marie-Anne Barny, Thierry Brévault, Bruno Chauvel, Denis Couvet, Elie Dassa, Hubert de Verneuil, Guillermina Hernandez-Raquet, Valérie Le Corre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Didier Nègre, Sergio Ochatt, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.

#### - absents, représentés :

Philippe Guerche, Joël Guillemain, Bernard Klonjkowski, Eliane Meurs, Nadia Naffakh, Jean-Louis Noyer, Patrick Saindrenan.

#### - absents, excusés :

Avner Bar Hen, Philippe Berny, Yves Bertheau (démissionnaire), Nathalie Eychenne, André Jestin, Marc Lavielle, Rémi Maximilien, Daniel Parzy.

## Annexe V risques non spécifiques et/ou indirects

### ***Risques liés à des caractères déjà obtenus par des techniques réglementées ou non réglementées***

Si les modifications induites restent dans le domaine de variabilité de l'espèce et de ses apparentés, les dangers seront les mêmes que ceux résultant de la sélection classique<sup>99</sup>.

Parmi les impacts sur les agrosystèmes déjà observés pour des plantes obtenues par des techniques réglementées ou non, certains étaient prévisibles et ont déjà largement été observés : il s'agit du contournement des gènes de résistance suite à l'évolution des organismes pathogènes ciblés (Burdon et al., 2014; Jones et al., 2014). De façon similaire, plusieurs populations d'espèces cibles des variétés exprimant une protéine Bt présentent une résistance (Devos et al., 2013; Tabashnik et al., 2013). Des effets inattendus ont parfois été observés : le cas souvent cité est celui des variétés de maïs portant le cytoplasme de stérilité « Texas » qui se sont avérées sensibles à l'helminthosporiose (Smith et al., 1971; Tatum, 1971).

- Risques directs<sup>100</sup> pour la santé humaine

Il s'agit d'une part, de la **toxicité potentielle** des composés nouveaux qui seraient présents dans la plante et ses sous-produits ou de leur impact en termes **d'équilibre nutritionnel**, en association avec l'exposition alimentaire ; d'autre part, de possibles phénomènes **allergiques** suite à des expositions par voie aérienne (pollen), cutanée (chez les travailleurs notamment) et alimentaire. Ces risques sont communs à toute nouvelle variété.

- Risques directs pour la santé des écosystèmes

Un premier type de risque concerne la dispersion et le risque **d'invasion** des communautés végétales naturelles, si les caractéristiques phénotypiques nouvelles de la variété sont susceptibles d'accroître sa capacité à persister dans les parcelles agricoles en formant des populations de repousses, à se disperser hors des milieux cultivés (populations férales) (Garnier and Lecomte, 2006; Garnier et al., 2006, 2008) jusqu'à éventuellement envahir des milieux naturels (ce qui n'a jamais été observé pour une plante cultivée à ce jour). Ce premier type de risque peut se réaliser également *via* le flux de gènes par le pollen vers des formes sauvages de la même espèce ou des espèces sauvages apparentées (Chèvre et al., 1997), si les hybrides possèdent une capacité accrue de persistance et/ou d'invasion (là également pas d'observation à ce jour).

---

<sup>99</sup> Bien que l'insertion d'une séquence codant un gène unique recherché par une NPBT puisse être considérée comme moins risquée que l'introgression classique par croisement et rétrocroisements d'une région codant ce même gène.

<sup>100</sup> Selon la directive 2001/18/CE

Un second type de risque concerne les impacts sur la biodiversité *via* les **modifications des interactions écologiques et notamment trophiques** entre la plante et des organismes pathogènes parasites ou consommateurs, ainsi que mutualistes ou symbiotes, ces organismes pouvant être issus de l'ensemble de la biodiversité du vivant (bactéries, champignons, plantes, insectes, autres animaux, etc.). Dans le cas de caractères visant directement à rendre la variété résistante ou tolérante à des bio-agresseurs, ou visant à améliorer la qualité de l'interaction avec des symbiotes, il est utile de distinguer les effets sur les organismes cibles des effets sur les organismes non-cibles. Les risques directs concernent par exemple la toxicité vis-à-vis de consommateurs animaux non-cibles, l'effet sur les communautés de la limitation d'une espèce cible (remplacement d'espèce) ou l'évolution de résistances chez l'espèce cible en réponse à la pression évolutive exercée par la variété.

- Risques indirects<sup>101</sup> :

Ils peuvent résulter des modifications des pratiques agricoles (notamment celles associées aux nouvelles variétés, comme l'usage de certaines matières actives (Bohan et al., 2005; Bonny, 2016; Lamichhane et al., 2016), des modifications d'habitats pour des espèces désirées ou indésirables, compte tenu de la multiplication de variétés « modifiées » (facilité de développement, pression évolutive).

Cas particulier de la résistance aux herbicides : dans le cas de l'obtention de plantes tolérantes à des herbicides, une expertise collective de l'INRA est disponible<sup>102</sup>. Cette question pourra être abordée par toute instance, y compris le HCB, dans un groupe de travail dédié.

La gestion de ces risques lors de l'utilisation de techniques réglementées (OGM) ou non réglementées (sélection classique, mutagenèse aléatoire) fait intervenir des systèmes de biovigilance qui permettent généralement d'identifier et de limiter l'apparition de ce type de risques, et d'en éviter le développement.

**Les risques potentiels découlant des caractères recherchés sont différents pour chaque caractère obtenu, et ne sont pas influencés par la technique qui a permis de les obtenir.**

### ***Risques liés à l'impact de l'homme sur le rythme de l'évolution des organismes cultivés***

Le contrôle des modifications chez les espèces cultivées peut induire une augmentation de la vitesse d'évolution phénotypique dirigée par l'homme. Ces modifications dirigées s'affranchissent des règles de l'évolution biologique basées sur des événements de mutation et de recombinaison au hasard, elles sont suivies de sélection naturelle (Vigouroux et al., 2011). Ainsi, l'homme pourrait encore accentuer son impact sur les organismes vivants qu'il cultive par rapport à celui induit par la domestication et la sélection de variations produites au hasard. L'homme a ainsi un effet non négligeable sur son environnement.

---

<sup>101</sup> Au titre de la directive 2001/18/CE

<sup>102</sup> <https://www6.paris.inra.fr/depe/Projets/Varietes-Vegetales-Tolerantes-aux-Herbicides>

Toutefois, depuis leur domestication, les plantes cultivées suivent un schéma évolutif dépendant de la sélection par les agriculteurs et les sélectionneurs (Vigouroux et al., 2011). Ainsi jusqu'à récemment, la sélection artificielle des plantes par l'homme n'était pas fondée sur une connaissance particulière des gènes impliqués. Ceci a changé dans les dernières années. Depuis une vingtaine d'années sont en effet apparues des techniques de mutagenèse au hasard suivies d'une sélection moléculaire de la modification désirée, généralement une délétion du gène (Mba, 2013; McCallum et al., 2000; Parry et al., 2009; Suprasanna et al., 2015; Tadele et al., 2010).

Les 20 dernières années ont aussi vu la possibilité de cribler rapidement au laboratoire une grande combinatoire de modifications au hasard à plusieurs endroits d'un gène ou dans plusieurs gènes simultanément, une approche souvent appelée "évolution dirigée" (même si elle utilise hasard et sélection au laboratoire). Une alternative est le design rationnel (Castle, 2004; Dixon et al., 2003; Rao, 2008; Yuan et al., 2005). Dans les deux cas, l'amélioration d'une protéine ou d'une voie physiologique au laboratoire est suivie de son introduction par mutagenèse dirigée ou transgénèse dans l'organisme d'intérêt.

### **Effet « reine rouge » sur la biodiversité**

Le changement de paramètres évolutifs, tel que le taux d'évolution phénotypique, pourrait provoquer des changements qualitatifs dans les interactions entre espèces et avoir des répercussions profondes sur les écosystèmes, selon l'adoption de ces plantes.

Les effets globaux sur la biodiversité sont difficilement prévisibles car fortement dépendants du degré d'exposition de l'environnement (adoption, modification de l'assolement, comme c'est le cas pour les cultures actuellement). Cependant on peut mentionner :

- Une pression de sélection accrue sur les bioagresseurs cibles (pathogènes, insectes) en cas de déploiement accéléré et généralisé de gènes de résistance dans les variétés cultivées. L'issue d'une telle augmentation de la pression de sélection est incertaine. En théorie, si les NPBT permettent l'accumulation simultanée, au sein des variétés de plantes, de multiples gènes de résistance majeurs et/ou de résistances quantitatives, la capacité des bioagresseurs à évoluer en réponse à cette nouvelle pression de sélection serait diminuée (Burdon et al., 2014; Jones et al., 2014). Cependant, un déploiement inapproprié des combinaisons de gènes de résistance pourrait conduire à l'effet inverse. D'autres réponses évolutives peuvent aussi se produire, tels que des changements de spectre d'hôte, les bioagresseurs devenant nuisibles pour de nouvelles espèces, une évolution également observée dans des cultures non génétiquement modifiées (Stukenbrock and McDonald, 2008).
- Une extension de l'agriculture dans de nouveaux milieux en cas d'introduction de variétés de plantes tolérantes à des conditions extrêmes telles que sécheresse et salinité. Une augmentation des surfaces agricoles si les caractères des plantes permettent des usages nouveaux tels que la chimie du végétal (biocarburants,

polymères, molécules thérapeutiques etc)<sup>103</sup>. L'augmentation des surfaces agricoles est la première cause de diminution de la biodiversité (Newbold et al., 2015), les écosystèmes non cultivés étant remplacés par des agro-écosystèmes. Il faut noter cependant que des impacts positifs peuvent aussi être attendus (par exemple par l'augmentation de la séquestration du carbone dans les sols qui pourrait aboutir à une baisse de l'émission de certains gaz à effets de serre ou *via* la réduction de l'usage des ressources fossiles).

Le CS du HCB indique que la majorité des méthodes de sélection, NPBT ou conventionnelles, peuvent présenter un biais dû à l'échantillonnage utilisé pour le re-semis (Vigouroux et al., 2011), qui nécessiterait des interventions correctives.

Par ailleurs le CS du HCB précise que les questions liées à la modification volontaire de plantes non cultivées (par exemple la modification de l'ambrosie afin de la rendre moins allergène) devront être discutées dans le cadre d'un questionnement différent.

### ***Risques liés à la persistance éventuelle des outils de vectorisation***

Dans le cas de l'utilisation de SDN, RdDM, ségréants négatifs, cisgénèse, intragénèse, plusieurs méthodes d'introduction cellulaire des réactifs (vectorisations) sont possibles (cf. section 2.3). Ces méthodes ne concernaient jusqu'à maintenant que les OGM "classiques". Certains pays comme les États-Unis distinguent le type de vectorisation pour autoriser une plante génétiquement modifiée<sup>104</sup>, régulant par exemple d'une manière spécifique l'utilisation de bactéries ou de virus.

En cas de vectorisation par la bactérie *Agrobacterium* et d'agro-infiltration, un risque de propagation de la bactérie portant un ADN-T modifié avec des séquences d'autres bactéries ou des séquences eucaryotes dans l'environnement apparaît. Cette dissémination est elle-même régulée et doit donc être vérifiée dans le cadre de son utilisation en milieu confiné pour l'obtention de SDN, RdDM, ségréants négatifs, cisgène, intragène. La bactérie peut être éliminée par des traitements antibiotiques adéquats mais il faut s'assurer qu'elle est effectivement absente avant une éventuelle utilisation de ces plantes en milieu non confiné<sup>105</sup>. Ceci demande que la vectorisation et l'absence de dissémination de la bactérie au cours du processus et dans les plantes commercialisées soient documentées.

Dans le cas d'une vectorisation passant par un épisode auto-répliatif (par exemple des séquences virales), cette auto-réplication peut persister. La plupart des séquences virales utilisées ne passent normalement pas dans les gamètes (voir 2.6.1), mais en l'absence de recul sur la question, ceci doit être vérifié.

Dans le cas de la biolistique, d'un passage par protoplastes ou de la régénération d'une plante à partir d'une cellule, de nombreuses modifications génétiques et épigénétiques non recherchées sont inévitables (voir effets hors-cible).

---

<sup>103</sup><http://institut.inra.fr/Missions/Eclairer-les-decisions/Prospectives/Toutes-les-actualites/Prospective-Agrimonde-Terra>

<sup>104</sup> [https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/biotechnology/SA\\_Regulations](https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/biotechnology/SA_Regulations)

<sup>105</sup> Le CS rappelle toutefois que, actuellement, les utilisations envisagées sont pour la plupart en milieu confiné.

### ***Risques liés aux méthodes de sélection des modifications***

Dans le cas des techniques de cisgénèse, intragenèse, transgénèse, SDN et RdDM, des risques additionnels concernent la persistance des marqueurs de sélection (souvent des transgènes provenant d'autres espèces ; cf. section 2.4). Il faut s'assurer que ces marqueurs de sélection ont été éliminés et que leur élimination n'a pas provoqué de dommages. Si ces marqueurs de sélection demeurent, les plantes sont alors *de facto* réglementairement des OGM et doivent être évaluées comme tels.

### ***Risques liés à l'expression d'ARN interférents dans la plante***

Une sous-catégorie de la cisgénèse (cisgénèse d'un gène de micro-ARN par exemple) et de l'intragenèse consiste en l'expression d'un micro-ARN, d'un ARN antisens ou d'un ARN double brin interférant avec l'expression des gènes par divers mécanismes (Auer and Frederick, 2009). Dans ce cas, l'ARN interférent peut causer des effets hors-cible de modification de l'expression génétique (Molesini et al., 2012; Xu et al., 2006). Les plantes possédant des enzymes d'amplification des petits ARN, ceux-ci peuvent être amplifiés dans la plante et se propager dans différentes cellules.

La spécificité des petits ARNs d'une taille de l'ordre de 20-25 paires de base est faible (Xu et al., 2006), surtout celle des micro-ARNs qui peuvent réprimer des cibles avec des mésappariements de plusieurs paires de bases (Molesini et al., 2012). Ceci peut affecter l'expression de nombreux gènes et donc en principe le phénotype de la plante, tel ses capacités de dispersion ou la production de métabolites et toxines, si la plante contient de tels gènes. Les plantes expriment de nombreux microARN qui, par mutation, pourraient avoir ce type d'effet. Il n'y actuellement, à notre connaissance, pas de cas d'induction de toxine par mutation d'un microARN.

### ***Risques liés à la dissémination des ARN interférents dans l'environnement***

Dans le cas d'intragenèse consistant à exprimer des ARN interférents, des ARN double brin peuvent être disséminés dans l'environnement et affecter d'autres organismes. En effet, certains organismes (nématodes, arthropodes, eucaryotes unicellulaires, etc.) peuvent importer les ARN double brin de l'environnement<sup>106</sup>. Les ARN double brin pourraient donc aussi atteindre d'autres organismes non ciblés et les affecter (Ramesh, 2013).

Ces effets hors-cible sont cependant difficiles à prévoir et il serait impossible de tester tous les organismes qui peuvent être rencontrés dans les conditions agricoles.

### ***Risques liés aux effets systémiques et multigénérationnels non intentionnels***

Dans le cadre de la technique RdDM, un effet multigénérationnel non strictement génétique (méthylation de l'ADN) est désiré, mais des effets à d'autres locus peuvent aussi être produits de manière non intentionnelle. Comme ci-dessus, ceci peut affecter l'expression de nombreux gènes.

---

<sup>106</sup> Ce phénomène est en particulier utilisé pour cibler un gène d'un organisme pathogène autre que la plante, par exemple un insecte (Younis et al., 2014). Ce ciblage d'un autre organisme fait partie d'un cas de transgène étranger (OGM classique) et ne rentre donc pas dans la catégorie de l'intragenèse.

Dans le cas des greffes, de tels effets non intentionnels peuvent survenir par propagation systémique dans la plante de petits ARN interférents.

Dans le cas des ségrégants négatifs, des effets multigénérationnels non intentionnels, en particulier via des méthylations de l'ADN, peuvent survenir. Ce type d'effet multigénérationnel peut aussi être observé lors de croisements interspécifiques, ou même lors des croisements classiques au sein de la même espèce.

Le CS précise qu'un risque de même nature existe théoriquement lors de croisements, sans qu'il ait pu être observé.

### ***Risques liés à la dépendance aux contextes génomique et environnemental***

De la même manière que deux modifications génétiques combinées peuvent provoquer des phénotypes inattendus, chaque modification interagit avec le reste du fonds génomique et l'environnement. La modification de l'expression du caractère sous l'effet des conditions environnementales est prise en compte lors de tests de nouvelles variétés dans différentes conditions environnementales, qui ne peuvent cependant pas couvrir toutes les conditions possibles. Pour l'instant, le recours à des modèles pour compléter ou remplacer les expérimentations n'est pas envisageable car les modèles statistiques d'interaction génotype x environnement ou ceux incluant des co-variables génomiques ont plus un caractère explicatif que prédictif (Gauffreteau et al., 2016; Gauffreteau, A. et al., 2015; Heslot et al., 2014).

La modification par le contexte génomique serait pertinente si l'autorisation d'une modification génétique était donnée de manière indépendante du fonds génétique (le reste du génome) utilisé. L'introduction de la même modification dans un autre fonds génétique de la même espèce et a fortiori d'une autre espèce peut avoir des effets différents sur le phénotype et sa variabilité (Chandler et al., 2013; Hall et al., 2007; Roles et al., 2016).

### ***Risques liés aux modifications hors-cible non intentionnelles du génome dues à la vectorisation et à la régénération.***

- Modifications non intentionnelles du génome dues à l'utilisation de protoplastes, d'Agrobacterium de transfection et/ou de régénération

Dans le cas de la biolistique, d'un passage par protoplastes ou de la régénération de plante à partir d'une cellule, des modifications génétiques et épigénétiques (dont certaines héréditaires), non recherchées, sont fréquentes, y compris des altérations de dosages chromosomiques (Bairu et al., 2011; van den Bulk et al., 1990; Jiang et al., 2011; Kaeppler et al., 1990; Machczyńska et al., 2015; Ong-Abdullah et al., 2015; Rhee et al., 2010; Stelpflug et al., 2014). De plus, la régénération d'une plante entière à partir de cellules non différenciées est réalisée dans le cadre de la propagation clonale de variétés obtenues par sélection classique. La raison pour laquelle un génotype peut fournir des phénotypes divers sous les mêmes conditions de culture reste encore mal comprise (Krishna et al., 2016) mais, certaines des sources étant connues, des actions peuvent être entreprises pour en réduire l'impact sur les plantes régénérées (Bairu et al., 2011). Elles incluent i) le choix d'un génotype exempt de variations ou mutations *in vivo* associé à la régénération par embryogenèse plutôt que par organogenèse (si disponible), ii) une diminution du nombre de repiquages entre la mise en culture des explants et la régénération, iii) l'utilisation de concentrations de régulateurs de

croissance aussi faibles que possible afin de raccourcir au maximum la phase de prolifération de tissus non différenciés avant la régénération et favoriser un meilleur contrôle du cycle cellulaire, et, iv) d'éviter l'action des effecteurs connus du stress oxydatif à l'origine des cassures et des risques d'hyper- et hypométhylation de l'ADN. La transformation par *Agrobacterium* peut aussi occasionnellement produire des modifications non intentionnelles, par exemple par insertion d'ADN chromosomique de la bactérie (Ülker et al., 2008) ou par cassures d'ADN-T (Schouten and Jacobsen, 2007).

Une publication a montré que dans le cas où des protoplastes de plantes étaient transfectés avec un plasmide codant à la fois la nucléase et l'ARN guide, il arrivait que dans 0,06% à 0,14% des cas, de petites insertions d'ADN provenant du plasmide puissent avoir lieu au site de coupure (Kim and Kim, 2016).

Dans le cas de l'**agro-infiltration**, l'intégration non recherchée des transgènes peut provoquer des effets hors-cible de même nature.

Le CS rappelle cependant qu'avec 20 ans de recul sur la génération de plantes transgéniques en utilisant ces méthodes de vectorisation, **il n'existe pas à sa connaissance de mise sur le marché de plantes présentant un problème lié à ces méthodes.**

- Modifications non intentionnelles du génome dues au site d'intégration pour SDN3, cisgénèse, intragénèse (en commun avec les OGM classiques)

Dans le cas de la **cisgénèse** et de l'**intragénèse**, l'intégration du transgène dans le génome peut produire des effets non contrôlés, comme l'interruption d'un gène endogène au locus, la formation de nouvelles séquences codantes ou la dérégulation de l'expression d'un gène au site d'intégration ou à d'autres locus en *trans*. Dans le cas de la cisgénèse, bien que le transgène soit normalement prévu pour être exprimé intact en sens direct, l'intégration peut provoquer une disruption ou une combinaison avec le locus endogène où se produit l'insertion, ce qui peut conduire à l'expression aberrante du transgène sous des séquences régulatrices non prévues, à la production d'un transcrite de fusion aberrant voire un transcrite en sens inverse, ce qui reviendrait alors à de l'intragénèse.

Concernant SDN3, les progrès de la génomique végétale permettront probablement d'identifier des « safe harbor loci » c'est-à-dire des sites localisés dans une région non codante et permettant une expression élevée et stable, qui pourront être ciblés pour l'insertion d'un transgène (Cantos et al., 2014).

### **Risques liés à la pléiotropie**

La modification d'un gène (SDN, ODM, RdDM) ou l'intégration d'un transgène (intragénèse, cisgénèse) peuvent affecter des caractères autres que ceux liés au phénotype recherché d'un organisme (pléiotropie). Des effets pléiotropes éventuels (c'est-à-dire affectant un caractère de la plante autre que le caractère recherché, bien que seul le gène ciblé soit modifié) peuvent découler des modifications génétiques ciblées. Ces effets pléiotropes existent quelles que soient les méthodes d'améliorations des plantes utilisées (croisements classiques, mutagenèse au hasard...). Il est difficile de les tester tous et de les anticiper dans des conditions de champ. Certains peuvent être identifiés par le sélectionneur au cours de l'obtention ou en cours d'usage de la culture de la variété. De telles modifications pourraient ne pas avoir été détectées en laboratoire lors de l'évaluation phénotypique des variétés si elles modifient par exemple la teneur en certains composés, ou la sensibilité à des pathogènes particuliers. Dans certains cas, il est possible d'imaginer que l'inactivation ou la

modulation d'un gène par SDN, ODM ou greffe puisse activer la synthèse de produits plus ou moins indésirables voire toxiques qui n'étaient pas synthétisés dans la variété cultivée initialement. Cependant il n'existe pas d'exemple connu.

### **Risques liés à de nouvelles interactions écologiques**

Ces nouvelles interactions écologiques concernent les micro-organismes, les plantes et les animaux. Ce qui peut conduire au déclin, voire à la disparition de certaines espèces, ou à l'inverse à la prolifération pour d'autres, et en conséquence à des changements de composition des communautés que ces espèces constituent. Cependant, ces espèces et ces communautés ont déjà été exposées aux effets des mutations naturelles, et ont eu l'opportunité de s'y adapter. Les mutations naturelles donnent lieu à des interactions écologiques qui s'inscrivent dans l'évolution des écosystèmes.

Les risques nouveaux qui peuvent en résulter (concernent la santé et l'environnement), on peut distinguer différents types de nouvelles interactions écologiques à examiner :

- interactions avec les différents microbiotes des humains, intestinal notamment, en relation avec le bon fonctionnement du système immunitaire (O'Doherty et al., 2014). pour une présentation des différents dysbioses pouvant en résulter ;
- interactions avec les différents microbiotes des plantes et des animaux qui les consomment ;
- interactions avec les micro-organismes des sols. Ces derniers ont notamment un rôle majeur dans le fonctionnement des écosystèmes : fertilité des sols, stockage du carbone, purification de l'eau et de l'air, ainsi que sur la santé des organismes vivants et notamment des humains ;
- interactions avec les autres espèces, notamment celles qui ont un rôle-clé dans le fonctionnement des écosystèmes, telles que les pollinisateurs.

Ces « nouvelles interactions écologiques » peuvent avoir un impact direct sur les humains, sans passer par d'autres espèces. De nouvelles protéines produites peuvent conduire, notamment, à des phénomènes d'allergie (Traidl-Hoffmann et al., 2009), ou à la réduction ou à l'augmentation de composés avantageux pour la santé humaine (vitamines, antioxydants, acides gras polyinsaturés...).

Les *Caractères Nouveaux* obtenus nécessitent une évaluation des risques pour l'homme ou les écosystèmes au cas par cas, avec des systèmes d'évaluation qui prennent en compte notamment les impacts sur les microbiotes humains et non humains.

## Annexe VI Glossaire

Pour des raisons d'homogénéité, le CS du HCB a choisi de donner à certains termes, qui pourraient être utilisés dans d'autres cadres une acception particulière précisée dans ce glossaire. Pour éviter toute confusion le CS tient à préciser que ce glossaire ne s'applique qu'à cet avis.

**Biovigilance mise en place par la loi d'orientation agricole de 1999** : L'objectif de cette dernière était d'identifier et suivre l'apparition éventuelle d'effets non intentionnels de nouvelles variétés d'OGM sur :

- les populations de bioagresseurs,
- la flore et la faune sauvages,
- les milieux aquatiques,
- les populations microbiennes (y compris les virus).

En effet, certains effets non-intentionnels pourraient n'apparaître que lors de mises en culture à grande échelle et à des pas de temps pluri-annuels (apparition de résistance chez les insectes cibles, d'adventices résistantes, par exemple). Mais ces questions concernent toute innovation variétale et ne sont pas spécifiques des produits des NPBT. Ces procédures de suivi post-commercialisation ont été précisées par l'EFSA en 2006 et actualisées en 2011 (EFSA, 2011). Elles ont été testées pour évaluation lors du projet européen AMIGA<sup>107</sup>. Les résultats de ce projet pourront aider à la réflexion sur la mise en place d'une surveillance à grande échelle. Celle-ci pourrait aussi s'articuler avec les réseaux de surveillance et d'observation existants (EFSA, 2014; Reboud et al., 2013). Il existe par ailleurs un Réseau national de surveillance biologique du territoire (SBT) dans le domaine végétal chargé du suivi des effets non intentionnels des pratiques phytosanitaires (coordonné par la DGAI – SQPV, cf axe 3 du plan Ecophyto II publié en octobre 2015) et un réseau national d'épidémiosurveillance des cultures.

**Caractère nouveau** : caractéristique nouvelle résultant de l'introduction d'un ou plusieurs gènes, ou de la modification d'expression d'un ou plusieurs gènes présents dans l'organisme étudié. Le CS souhaite distinguer deux types de nouveautés :

- l'introduction, dans une variété, d'un caractère identifié dans une autre variété ou dans une espèce proche ou compatible sexuellement : il s'agit alors de valoriser la diversité génétique existante par l'introduction de formes d'allèles d'intérêt. Il n'y a donc pas d'ajout<sup>108</sup> de séquences génétiques, ni de modification de la fonction des gènes existant chez la plante ;

---

<sup>107</sup>AMIGA (FP7, 2011 – 2016) : <http://www.amigaproject.eu/>

<sup>108</sup> Le concept d'ajout est important à clarifier pour la cisgénèse et l'intragénèse. Du matériel génétique peut être introduit mais les gènes apportés préexistent sous une forme allélique différente dans l'espèce ou sont présents dans certaines de variétés de la même espèce.

- l'introduction d'un caractère totalement inédit dans la variété et/ou des espèces proches<sup>109</sup> : le *Caractère Nouveau* vient du fait que le gène n'existe pas naturellement dans l'espèce considérée ou que la modification d'un gène présent introduit une voie métabolique nouvelle ou une fonction nouvelle dans l'espèce

**Directive européenne 2001/18/CE** : La directive européenne 2001/18/CE encadre la mise en culture et la mise sur le marché des plantes GM (non exemptées dans l'annexe IB). Elle porte sur l'événement d'insertion d'un transgène et permet l'autorisation d'importation ou de culture de plantes présentant un tel événement quel que soit le fond génétique.

Le dossier de demande d'autorisation (importation à des fins d'alimentation humaine ou animale ou de mise en culture) d'une plante génétiquement modifiée, comprend un descriptif (défini dans l'annexe IIIb de la directive 2001/18) complet de la plante et de sa transformation ainsi que des éléments relatifs à sa mise en culture (identification taxonomique ; reproduction, compatibilité avec d'autres espèces végétales sauvages ou cultivées, répartition en Europe des espèces compatibles et capacité de survie, dissémination liée à la qualité et viabilité du pollen, mécanismes d'interaction avec les organismes cibles et non-cibles, gestion des sites à la fin de la mise en culture etc) .

Une évaluation des risques sanitaires (allergénicité, toxicité et composition nutritionnelle) et environnementaux (risques directs et indirects, immédiats ou différés ainsi que les effets cumulés à long terme) est réalisée<sup>1</sup>. L'évaluation des risques environnementaux s'effectue au moyen d'une comparaison entre la PGM et l'organisme non transformé. L'annexe 2 de la directive liste les effets négatifs à examiner avec précision. Les dossiers des pétitionnaires doivent documenter nécessairement : (i) s'il existe une persistance et un danger d'envahissement incluant le flux de gènes entre plantes ; (ii) de possibles transfert de gènes entre plantes et microorganismes ; (iii) les interactions entre la PGM et les organismes cibles, et leurs conséquences ; (iv) les interactions entre les PGM et les organismes non-cibles ; (v) les effets sur les processus biogéochimiques. Les voies d'exposition doivent aussi être examinées. Enfin il conviendra de conclure en proposant une stratégie de gestion des risques. Le dossier doit indiquer la surveillance post-commercialisation qui s'articule avec le plan de surveillance environnemental au moyen de scénarios indiquant diverses situations critiques. Elle comprend deux volets : une surveillance spécifique des effets prévisibles (par exemple : surveillance de l'apparition d'une résistance d'insectes cibles) et une surveillance générale c'est-à-dire sans hypothèse préalable (Regnault-Roger, 2014).

**Effecteurs** : il s'agit des molécules (protéines ou acides nucléiques (ARN ou ADN) utilisés afin d'obtenir la modification attendue dans la plante.

---

<sup>109</sup> Cette distinction est mise en avant dans la réglementation canadienne sur les OGM qui ne prévoit une évaluation que pour les variétés qui présentent un caractère nouveau qui ne préexiste pas dans la variété ou dans une espèce proche. ( <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/gmf-agm/index-fra.php> )

**Mésocosme** : Un mésocosme est un lieu confiné et contrôlé ou semi-contrôlé où un expérimentateur peut faire varier sur une période de temps significative, tout ou partie des paramètres du milieu, et donc mettre en évidence un grand nombre d'effets écologiques qui autrement seraient passés inaperçus, sur les espèces en interaction, notamment les micro-organismes. L'expérimentation doit avoir lieu sur une durée de temps suffisante pour que les interactions écologiques et leurs rétroactions aient le temps de s'établir. L'utilisation de mésocosmes, lorsque ceux-ci pourraient s'avérer pertinents dans les évaluations préalables à la mise en champ, devra être envisagée. Ce type d'expérimentation, en amont des essais au champ, pourrait permettre de révéler des modifications de fonctionnement des communautés microbiennes et animales des sols et d'en analyser les causes (De Vries et al., 2015; Wolfarth et al., 2016) ou d'analyser les effets du changement global à des échelles spatiales fines (Stewart et al., 2013).

Des expérimentations en mésocosmes permettraient par exemple d'évaluer l'impact d'un caractère nouveau sur la diversité du microbiote comme le permettent actuellement les connaissances acquises en écologie microbienne.

**Population** : Ensemble des individus d'une même espèce qui vivent dans un même lieu et interagissent entre eux. Le type d'interaction considéré varie selon les disciplines. Pour la génétique des populations, une population correspond à un ensemble d'individus qui se reproduisent entre eux. En écologie des populations, l'accent est mis sur le partage d'un même ensemble de ressources trophiques, ce qui détermine la dynamique démographique de la population.

**Vecteurs** : Dans cette acception un vecteur est un outil de transfert de gène. Le besoin d'un vecteur vient du fait que les informations génétiques ne sont pas aisément transférées dans une cellule.

Un vecteur est composé de deux types de molécules :

- la molécule à transférer ; elle est le support de l'information génétique, que ce soit un ARN ou un ADN. Un même vecteur peut transférer plusieurs molécules, y compris plusieurs types de molécules ;
- le complexe de molécules qui permet le transfert. Le plus souvent pour les plantes, ce complexe est d'origine virale, ou bactérienne. Il s'agit de microorganismes qui sont modifiés pour transférer l'information génétique. La modification de l'organisme parental qui devient le vecteur, vise à faire disparaître le pouvoir pathogène du micro-organisme d'origine. Le vecteur peut être manipulé facilement *in vitro* et sera le véhicule du transfert.

Le plus souvent, lors ou après le transfert la composante [2] du vecteur est éliminée de la cellule dans laquelle l'information génétique est introduite.

Il existe des vecteurs dits "inertes" car composés de molécules de synthèse dont les capacités physico-chimiques permettent l'introduction du matériel génétique dans la cellule. Il existe aussi des méthodes essentiellement physiques de transfert (électroporation, ultrasons...).

Le choix du vecteur est adapté à la cellule dans laquelle l'information génétique est transférée, selon des critères d'efficacité et de persistance.

Les protéines peuvent aussi être vectorisées, le plus souvent par des méthodes physiques. Le fait d'utiliser un vecteur, quel qu'il soit, entraîne une modification transitoire de la cellule cible.