



HAL
open science

Avis en réponse à la saisine du 2 juillet 2020 relative au projet de décret modifiant l'article D.531-2 du code de l'environnement

. Comité Scientifique Du Haut Conseil Des Biotechnologies, Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno B. Chauvel, Cécile Collonnier, Denis Couvet, et al.

► To cite this version:

. Comité Scientifique Du Haut Conseil Des Biotechnologies, Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, et al.. Avis en réponse à la saisine du 2 juillet 2020 relative au projet de décret modifiant l'article D.531-2 du code de l'environnement. [0] Haut Conseil des Biotechnologies. 2020, 44 p. hal-02917686

HAL Id: hal-02917686

<https://hal.inrae.fr/hal-02917686>

Submitted on 19 Aug 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 - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International License

COMITÉ SCIENTIFIQUE

AVIS

**en réponse à la saisine du 2 juillet 2020
relative au projet de décret
modifiant l'article D.531-2 du code de l'environnement¹.**

Paris, le 29 juin 2020

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi conjointement le 2 juillet 2020 par les Ministres de la Transition écologique et solidaire, de l'Agriculture et de l'Alimentation, et de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, d'une demande d'avis sur le projet de décret relatif à la modification de la liste des techniques de modification génétique ayant fait l'objet d'une utilisation traditionnelle sans inconvénient avéré pour la santé publique ou l'environnement.

Pour répondre à cette saisine, le Comité scientifique (CS)² du HCB s'est constitué un groupe de travail³ d'experts sélectionnés pour leurs compétences dans les disciplines requises.

Le présent avis a été élaboré sur la base du travail préparatoire de ces experts. Il a été discuté et adopté en séance du 29 juin 2020 en présentiel et en visioconférence sous la présidence de Jean-Christophe Pagès, et transmis aux Autorités compétentes le 7 juillet 2020⁴.

¹ La saisine est reproduite dans l'Annexe 1.

² La composition du CS du HCB et les modalités de l'élaboration de l'avis sont indiquées dans l'Annexe 2.

³ La composition du groupe de travail du CS et ses modalités de travail sont indiquées dans l'Annexe 3.

⁴ Citation recommandée : Haut Conseil des biotechnologies (2020). Avis du Comité scientifique en réponse à la saisine du 2 juillet 2020 relative au projet de décret modifiant l'article D.531-2 du code de l'environnement (Réf. HCB-2020.07.07-1). (Paris, HCB), 44 p. Disponible sur <http://www.hautconseildesbiotechnologies.fr>.

ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AIEA : Agence internationale de l'énergie atomique

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

AS : azoture de sodium (*sodium azide*)

BER : *Base excision repair* (réparation par excision de base)

Cas9 : *CRISPR-associated protein 9* (protéine 9 associée aux CRISPR)

CRISPR : *clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats* (courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées)

CS : Comité scientifique du HCB

CEES : Comité économique, éthique et social du HCB

EFSA : *European Food Safety Authority* (Autorité européenne de sécurité des aliments)

EMS : *Ethyl methanesulfonate* (Méthanesulfonate d'éthyle)

ENU : *N-ethyl-N-nitrosourea* (N-nitroso-N-éthylurée)

FAO : *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)

GT : groupe de travail

HCB : Haut Conseil des biotechnologies

HR : *Homologous recombination* (recombinaison homologue)

MMR : *Mismatch repair* (réparation de mésappariement)

MNU : *N-methyl-N-nitrosourea* (N-nitroso-N-méthylurée)

NER : *Nucleotide excision repair* (réparation par excision de nucléotide)

NHEJ : *Non Homologous End Joining* (liaison d'extrémités sans homologie)

OGM : organisme génétiquement modifié

ROS : *Reactive oxygen species* (dérivés réactifs de l'oxygène)

SNP : *Single Nucleotide Polymorphism* (Polymorphisme ponctuel, au niveau d'un nucléotide)

TILLING : *Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*

GLOSSAIRE

Agent mutagène : Agent physique, chimique ou biologique qui, par sa réactivité, induit un changement moléculaire de l'ADN favorisant l'apparition d'une mutation.

Cals : Amas de cellules indifférenciées.

Génotype : Le génotype d'une cellule ou d'un individu fait référence à sa séquence d'ADN. Il reflète la composition allélique de l'ensemble des séquences génomiques de la cellule ou de l'individu, ou de la séquence d'un fragment du génome.

Génotyper : Déterminer le génotype.

Haploïdes doublés : Haploïdes (défini plus bas, voir Ploïdie) dont le nombre de chromosomes a doublé spontanément ou après traitement avec des substances inductives comme la colchicine.

Imidazolinones : Famille d'herbicides inhibant l'acétolactate synthase (ALS), enzyme nécessaire à la synthèse de valine, leucine et isoleucine.

Microspores : Cellule haploïde issue de la méiose, qui donne un gamétophyte mâle.

Mutagenèse : Processus de formation de mutations.

Mutagenèse aléatoire / mutagenèse ciblée : La formation de mutations peut être aléatoire : sans spécificité de site à l'échelle moléculaire ; ou ciblée : spécifique d'une séquence cible déterminée.

Mutagenèse induite / mutagenèse spontanée : La mutagenèse induite résulte de l'utilisation d'un agent ou d'une méthode de mutagenèse. La mutagenèse spontanée est indépendante d'un agent ajouté, et survient naturellement du fait des caractéristiques des organismes vivants (la définition du vivant repose sur la capacité intrinsèque à muter).

Mutagéniser : Soumettre un individu ou une cellule à un agent mutagène.

Organisme génétiquement modifié : Un organisme, à l'exception des êtres humains, dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle (extrait de la définition réglementaire de la directive 2001/18/CE⁵. La définition est assortie d'une liste non exhaustive de techniques conduisant à une modification génétique, d'une liste exhaustive de techniques non considérées comme entraînant une modification génétique, et d'une liste exhaustive de techniques de modification génétique produisant des organismes à exclure du champ d'application de la directive).

Phénotype : Caractéristiques visibles (morphologie, capacité à survivre dans un environnement particulier...) ou biologiques (résistance à une molécule, à un pathogène, métabolisme spécifique...) d'un individu ou d'une cellule. Les caractéristiques agronomiques d'une variété font partie du phénotype.

Phénotyper : Déterminer le phénotype.

Ploïdie, haploïdie, diploïdie, polyploïdie, aneuploïdie : La ploïdie indique le nombre d'exemplaires de lots complets de chromosomes présents chez un individu ou une cellule donné(e), indépendamment du nombre de chromosomes de l'espèce. Pour une espèce contenant un lot de n chromosomes, un individu ou une cellule dite haploïde contient un lot unique de chromosomes, soit n (une fois n), un individu ou une cellule diploïde en contient 2n, un individu ou une cellule polyploïde, xn. Une cellule ou un individu est aneuploïde si son contenu chromosomique est anormal. Soit parce que l'un de ses lots de chromosomes est incomplet, soit par la présence d'un ou plusieurs chromosomes supplémentaires ou à la suite de translocations (échange de fragments de chromosomes).

⁵ Directive 2001/18/CE du Parlement européen et du Conseil du 12 mars 2001 relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement et abrogeant la directive 90/220/CEE du Conseil.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32001L0018:FR:HTML>

Polymorphisme : Le polymorphisme d'une séquence résulte d'événement(s) de mutation(s), et indique sa variabilité entre individus ou au sein d'un organisme après mutation somatique. Pour chaque séquence, il est représenté par une valeur comprise entre 0 (absence) et 0,99 (1 représenterait une absence de séquence de référence). Un polymorphisme est défini par sa position dans le génome et sa séquence. Le fait qu'une séquence présente un polymorphisme n'implique pas que chacune des différentes formes moléculaires est associée à des différences de phénotype.

Protoplastes : Cellules végétales sans paroi obtenues par digestion de la paroi pecto-cellulosique.

Sélection positive, sélection purifiante : Dès lors qu'une mutation apparaît, elle peut être soumise à sélection, principalement si elle est associée à une variation de phénotype. Cette sélection dépend des conditions environnementales et de l'effet de la mutation. La sélection est dite purifiante si elle conduit à la disparition de la mutation ; la sélection est dite positive si elle donne un avantage au porteur, ce qui tend à augmenter la fréquence du polymorphisme.

Régénération : En biologie végétale, la régénération désigne le développement d'une plante entière à partir d'une cellule (ou d'un groupe de cellules) par divisions cellulaires successives.

Totipotence : Aptitude d'une cellule peu ou non différenciée à garder toutes ses potentialités et à donner naissance à tous les types de cellules constituant un individu.

Variations somaclonales : Toute variation génétique et épigénétique induite par le fait de cultiver des tissus ou des cellules *in vitro*.

RESUME⁶

Suite à la saisine gouvernementale sollicitant l'avis du HCB sur le projet de décret de modification du code de l'environnement⁷, le bureau du HCB a adressé la question suivante à son Comité scientifique (CS) : « Sur un plan biologique, en quoi la mutagenèse aléatoire *in vitro* telle que définie par le décret se distingue-t-elle des autres techniques de sélection végétale ? ». Selon le projet de décret, la mutagenèse aléatoire *in vitro* consiste à « soumettre des cellules végétales cultivées *in vitro* à des agents mutagènes chimiques ou physiques ». Pour y répondre, le CS a en particulier i) évalué en quoi la mutagenèse aléatoire *in vitro* telle que définie par le projet de décret constituerait une technique à part entière, qui mériterait, pour une raison particulière, d'être traitée différemment des autres applications de mutagenèse aléatoire et des autres applications de culture *in vitro* considérées comme des méthodes conventionnelles de sélection variétale et ii) analysé dans quelle mesure et depuis quand la mutagenèse aléatoire *in vitro* est utilisée en sélection variétale.

Le bureau a constitué un groupe de travail (GT) de trois membres du CS, en charge de l'analyse préparant le travail du comité. Le GT a étudié la littérature et sollicité une expertise scientifique externe de chercheurs reconnus dans les domaines en lien avec la question posée, notamment en biologie cellulaire.

Le CS souligne que le terme de « cellules végétales » n'est pas univoque et est soumis à interprétation. Sur la base des travaux du GT, le CS a décidé de réserver, dans son avis, l'expression « cellules végétales » aux cellules isolées, excluant les entités pluricellulaires.

Afin d'identifier d'éventuelles différences, l'analyse a porté sur quatre groupes de techniques utilisées en sélection variétale : la mutagenèse *in vivo*, la culture *in vitro* en l'absence d'agents destinés à induire des mutations, la mutagenèse *in vitro* sur des entités pluricellulaires et la mutagenèse *in vitro* sur des cellules végétales isolées.

Pour chaque technique, le GT a rassemblé les données précisant le type de matériel utilisé, les spécificités d'application, l'historique, les agents mutagènes utilisés, la variabilité génétique induite, les mécanismes moléculaires impliqués et les phénotypes générés.

Points importants à souligner :

La mutagenèse induite, appliquée sur de nombreuses espèces (plus de 3300 mutants cités dans la base de données non exhaustive de l'AIEA en 2020) avec des agents physiques (depuis le début du 20^e siècle) et chimiques (deuxième moitié du 20^e siècle), a pour objectif d'augmenter la fréquence d'apparition des mutations, en comparaison à celle des mutations spontanées. Ceci, afin de réduire le nombre d'individus à phénotyper/génotyper dans la recherche de mutants d'intérêt agronomique. La mutagenèse induite, pour des raisons de simplicité de mise en œuvre, permet de créer ou de modifier des caractères à déterminisme génétique simple.

La mutagenèse *in vitro* d'entités pluricellulaires s'est développée dans les années 1960-1970 principalement pour réaliser des traitements physiques en conditions d'asepsie en valorisant la capacité de régénération en plante entière de certaines espèces.

⁶ Ce résumé ne se substitue pas à l'analyse développée dans cet avis.

⁷ Projet de décret relatif à la modification de la liste des techniques d'obtention d'organismes génétiquement modifiés ayant fait l'objet d'une utilisation traditionnelle sans inconvénient avéré pour la santé publique ou l'environnement.

La mutagenèse suivie de la sélection *in vitro* de cellules végétales, initiée sur le tabac en 1974, reste très limitée dans son utilisation car elle suppose une expression, dans la colonie cellulaire dérivée de la cellule soumise à la mutagenèse, du caractère recherché. Les cribles de sélection les plus faciles à mettre en œuvre sont ceux de résistance à une molécule toxique (herbicides, toxines de parasite...). Cette approche *in vitro* présente l'intérêt de pouvoir effectuer la sélection sur un très grand nombre d'entités (plusieurs milliards de cellules) et permet donc d'augmenter les chances de sélectionner un événement rare.

Différentes techniques de culture *in vitro* ont été développées et utilisées en sélection variétale, dont la production d'haploïdes doublés de colza par culture de microspores, laquelle a permis de créer des variétés commercialisées à grande échelle depuis 1992 ('Goéland') ; selon l'enquête de l'Académie d'Agriculture de 2017, une large majorité des variétés de colza cultivées en France est issue de culture de microspores. Cette technique permet de générer des populations homozygotes de plantes portant des mutations dominantes ou récessives qui peuvent ensuite être phénotypées directement en conditions naturelles permettant la sélection de caractères.

Sur le plan biochimique, appliquée *in vivo* ou *in vitro*, la mutagenèse induite augmente la fréquence des modifications de l'ADN par rapport à la fréquence de mutations spontanées. La culture de cellules ou de tissus, surtout sur des temps longs et dans un état indifférencié, du fait des conditions environnementales particulières liées à la culture *in vitro* (milieux de culture, oxygénation, environnement climatique des chambres de culture...), induit le même type de mutations, à des fréquences moindres. Notons que ces conditions peuvent aussi induire des mécanismes d'adaptation épigénétique. Les mécanismes de réparation de l'ADN activés par les altérations induites par un agent mutagène et/ou les conditions de culture, sont identiques, que les cellules soient cultivées *in vitro* ou *in vivo*. Il en résulte que les mutations observées sont biochimiquement identiques. Toutefois, leur type, leur fréquence, et donc la fréquence à laquelle chaque gène pourra présenter une mutation, dépendent tout à la fois, de l'agent utilisé, de son dosage, du génotype et des conditions de culture.

Sur le plan phénotypique

Les mécanismes biochimiques d'induction des mutations étant les mêmes pour les mutations spontanées, la mutagenèse induite (*in vivo* ou *in vitro*) et la culture *in vitro* (variations somaclonales) – chaque agent mutagène induisant préférentiellement l'une des formes de la mutagenèse spontanée –, il est attendu que l'on produise potentiellement les mêmes types de variants génétiques et phénotypiques, quelle que soit l'approche. Le choix de l'approche dépendra de la fréquence escomptée des mutations induites, de l'aptitude à la régénération du matériel utilisé *in vitro* et surtout des conditions/stades et facilité de sélection du phénotype recherché.

A titre d'exemple, des mutations du gène de l'acétolactate synthase, conférant la résistance à certains herbicides, ont été obtenues chez le colza par mutagenèse aléatoire *in vitro* de microspores en présence d'un agent mutagène, mais également à partir de culture de protoplastes sans présence d'agent mutagène, ainsi que spontanément au champ.

Le CS regrette que le projet de décret se focalise sur la dangerosité d'un ensemble de techniques sans fondement scientifique, et sans aborder l'impact environnemental, voire les conséquences économiques, éthiques et sociales potentielles⁸ des traits générés, quelle que soit leur méthode d'obtention.

⁸ Domaine du ressort du Comité économique, éthique et social.

Le CS note qu'en l'absence de différences à l'échelle moléculaire, et dans le cadre actuel des moyens de contrôle reposant sur des techniques de biologie moléculaire, la traçabilité et l'attribution de mutations à une technique donnée d'obtention seraient très compliquées.

En conclusion, le Comité scientifique du HCB n'identifie pas de différences biochimiques entre les mutations, qu'elles soient obtenues par mutagenèse aléatoire *in vitro*, *in vivo*, ou spontanément, sur cellules isolées ou entités pluricellulaires. Il n'y a pas non plus de différences entre les phénotypes induits par ces techniques. Seules leur probabilité d'obtention et leur facilité de sélection varient.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	10
1.1. ÉLÉMENTS DE CONTEXTE	10
1.2. SAISINE DU 2 JUILLET 2020	10
1.3. MODALITES DE TRAITEMENT AU HCB	10
1.4. QUESTION POSEE AU COMITE SCIENTIFIQUE.....	11
1.5. DEFINITION DES TERMES ET TRADUCTION DE LA QUESTION	11
1.6. METHODOLOGIE DE TRAVAIL.....	12
2. LA MUTAGENESE EN SELECTION VARIETALE	13
2.1. LES DIFFERENTES SOURCES DE VARIABILITE GENETIQUE EN SELECTION VARIETALE.....	13
2.2. LES MUTATIONS INDUITES PAR MUTAGENESE ALEATOIRE.....	14
2.3. HISTORIQUE DE LA MUTAGENESE EN SELECTION VARIETALE.....	14
3. LA CULTURE <i>IN VITRO</i> EN SELECTION VARIETALE	15
3.1. LES TECHNIQUES DE CULTURE <i>IN VITRO</i>	15
3.2. INTERETS EN SELECTION VARIETALE	15
3.3. HISTORIQUE DE DEVELOPPEMENT ET EXEMPLES D'APPLICATION EN SELECTION VARIETALE	16
4. L'APPLICATION <i>IN VITRO</i> DE TECHNIQUES DE MUTAGENESE ALEATOIRE	17
4.1. QUEL INTERET EN SELECTION VARIETALE ?	17
4.2. HISTORIQUE DE DEVELOPPEMENT ET EXEMPLES D'APPLICATION EN SELECTION VARIETALE	18
5. EN QUOI LA « MUTAGENESE ALEATOIRE <i>IN VITRO</i> » TELLE QUE DEFINIE PAR LE PROJET DE DECRET SE DISTINGUE-T-ELLE DES AUTRES TECHNIQUES DE SELECTION VARIETALE SUR LE PLAN BIOLOGIQUE ?	19
5.1. COMPARAISON EN TERMES DE VARIABILITE GENETIQUE INDUITE.....	19
5.1.1. Les mutations spontanées.....	19
5.1.2. Les mutations induites par mutagenèse aléatoire	21
5.1.3. Les variations somaclonales en culture <i>in vitro</i>	22

5.1.4. Existe-t-il une spécificité de la variabilité génétique induite par mutagenèse aléatoire appliquée <i>in vitro</i> par rapport à celle induite par mutagenèse aléatoire appliquée <i>in vivo</i> et par culture <i>in vitro</i> ?.....	24
5.1.5. Existe-t-il une spécificité de la variabilité génétique induite par mutagenèse <i>in vitro</i> de cellules végétales par rapport à celle induite par mutagenèse <i>in vitro</i> d'autres matériels végétaux ?	24
5.2. COMPARAISON EN TERMES DE PHENOTYPES INDUITS	24
5.2.1. Spécificités des différentes techniques de mutagenèse dans l'induction de phénotypes.....	24
5.2.2. Existe-t-il des phénotypes particuliers résultant d'une mutagenèse aléatoire <i>in vitro</i> par rapport aux phénotypes résultant d'une mutagenèse aléatoire <i>in vivo</i> ou à un processus de sélection impliquant une culture <i>in vitro</i> ?	27
5.2.3. Existe-t-il des phénotypes particuliers résultant d'une mutagenèse aléatoire <i>in vitro</i> de cellules végétales par rapport aux phénotypes résultant d'une mutagenèse aléatoire <i>in vitro</i> d'autres matériels végétaux ?	27
5.3. Y A-T-IL UNE INTERACTION ENTRE MUTAGENESE ALEATOIRE ET CULTURE <i>IN VITRO</i> ?	28
6. REMARQUES COMPLEMENTAIRES	29
7. BIBLIOGRAPHIE	30
ANNEXE 1 : SAISINE	36
ANNEXE 2 : COMITE SCIENTIFIQUE DU HCB ET ELABORATION DE L'AVIS	38
ANNEXE 3 : GROUPE DE TRAVAIL DU CS ET TRAVAIL PREPARATOIRE A L'AVIS	39
ANNEXE 4 : TECHNIQUES DE CULTURE <i>IN VITRO</i>	40
ANNEXE 5 : ANALYSE DE LA BASE DE DONNEES DE MUTANTS FAO/AIEA	41

1. Introduction

1.1. Éléments de contexte

La présente saisine s'inscrit dans le prolongement d'une question posée par courrier au Premier Ministre fin 2014 au sujet de la réglementation de variétés tolérantes à des herbicides. L'absence de réponse de l'administration équivalant à une décision implicite de rejet, les associations à l'origine du courrier ont formé un recours devant le Conseil d'État. Dans sa décision du 3 octobre 2016, celui-ci a adressé quatre questions préjudicielles à la Cour de Justice de l'Union européenne (CJUE) et sursis à statuer sur la requête dans l'attente des réponses à ses questions.

A la suite de l'arrêt préjudiciel de la CJUE du 25 juillet 2018 clarifiant le champ d'application de la directive 2001/18, le Conseil d'État, dans sa décision du 7 février 2020, enjoint au Premier ministre, dans un délai de six mois, de modifier l'article D.531-2 du code de l'environnement en fixant par décret la liste limitative des techniques ou méthodes de mutagenèse traditionnellement utilisées pour diverses applications et dont la sécurité est avérée depuis longtemps.

Le 30 avril 2020, les autorités françaises notifient la Commission européenne d'un projet de décret relatif à la modification de la liste des techniques d'obtention d'OGM. Entre autres, le projet de décret prévoit que « la mutagenèse aléatoire *in vitro* consistant à soumettre des cellules végétales cultivées *in vitro* à des agents mutagènes chimiques ou physiques » soit exclue de l'exemption de la mutagenèse du champ d'application de la réglementation relative aux OGM.

1.2. Saisine du 2 juillet 2020

Selon l'article L.531-2, la liste des techniques générant des organismes exemptés du champ d'application de la réglementation relative aux OGM doit être fixée par décret après avis du HCB.

Considérant qu'un avis du HCB devrait être transmis aux autorités compétentes au plus tard le 7 juillet 2020 pour permettre la tenue d'une consultation du public d'un mois avant l'adoption du décret, elle-même censée advenir avant le 7 août 2020 pour respecter la décision du Conseil d'État du 7 février 2020, le Président du HCB s'est inquiété auprès des autorités compétentes au sujet de la saisine qui devait lui être adressée.

A défaut de saisine signée, le Président a obtenu, le 9 juin 2020, le texte validé de la saisine du HCB. La saisine finalisée, datée du 2 juillet 2020 – reçue le 3 juillet par voie électronique –, est reproduite en Annexe 1.

Dans ce texte, après un bref rappel du contexte, les Ministres de la Transition écologique et solidaire, de l'Agriculture et de l'Alimentation, et de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, sollicitent conjointement l'avis du HCB sur le projet de décret relatif à la modification de la liste des techniques d'obtention d'OGM ayant fait l'objet d'une utilisation traditionnelle sans inconvénient avéré pour la santé publique ou l'environnement, ainsi que sur deux projets d'arrêtés en lien avec ce texte, sans poser de question précise. Ils rappellent également que l'avis du HCB est constitué d'un avis du Comité scientifique (CS), et de recommandations du Comité économique, éthique et social (CEES) (Annexe 1).

1.3. Modalités de traitement au HCB

Dès l'obtention du texte stabilisé de la saisine le 9 juin 2020, le bureau s'est réuni pour en définir les modalités de traitement au HCB.

Considérant les contraintes de temps, le bureau a décidé, pour chacun des comités, de (1) définir une question à traiter, (2) mettre en place un groupe de travail⁹, et (3) organiser une réunion supplémentaire, de telle sorte qu'un avis du HCB, constitué d'un avis du CS et de recommandations du CEES, puisse être rendu aux autorités compétentes dès la première semaine de juillet.

Deux visioconférences conjointes entre les deux groupes de travail ont été organisées, l'une pour le lancement des travaux de la saisine le 10 juin, et l'autre pour un point d'étape et d'échanges entre les deux groupes le 18 juin. En plus de ces réunions conjointes, chaque groupe de travail s'est réuni autant que nécessaire pour remplir sa mission, et autant que possible dans les temps impartis.¹⁰

L'assemblée plénière annuelle de l'instance prévue le 24 juin a été l'occasion, pour les groupes de travail, de présenter leurs travaux respectifs et de recueillir les premières analyses et contributions des membres du HCB.

Chaque groupe de travail a ensuite finalisé ses travaux pour les soumettre le 26 juin à son comité respectif, sous forme de projet d'avis d'une part, et de projet de recommandations d'autre part, pour un examen en séance du CS le 29 juin et du CEES le 1^{er} juillet.

1.4. Question posée au Comité scientifique

Considérant l'article 1^{er} du projet de décret, le bureau a adressé la question suivante au CS : « Sur un plan biologique, en quoi la mutagenèse aléatoire *in vitro* telle que définie dans le décret se distingue-t-elle des autres techniques de sélection végétale ? »

Selon le projet de décret, la mutagenèse aléatoire *in vitro* consiste à « soumettre des cellules végétales cultivées *in vitro* à des agents mutagènes chimiques ou physiques ».

Le groupe de travail a pris acte de la question du bureau et de cette définition du projet de décret, tout en identifiant la nécessité (1) de clarifier les différents termes utilisés, ceux-ci sortant de leur usage habituel dans le monde de la recherche et de l'amélioration des plantes, et (2) de traduire la demande en une question plus opérationnelle.

1.5. Définition des termes et traduction de la question

L'expression « mutagenèse aléatoire *in vitro* » ne désigne pas une technique particulière à laquelle se réfèreraient communément chercheurs et obtenteurs, mais couvre plutôt un ensemble de techniques de mutagenèse appliquées de diverses façons en conditions de culture *in vitro*. Par ailleurs, la définition qu'en donne le projet de décret (« soumettre des cellules végétales cultivées *in vitro* à des agents mutagènes chimiques ou physiques ») n'est ni évidente, ni univoque, ce qui nécessite une clarification de la question posée. Les brèves définitions et descriptions données dans cette introduction seront enrichies et approfondies au fur et à mesure de l'avis.

La mutagenèse est le processus par lequel sont générées des mutations, ou modifications, dans les séquences d'ADN composant le matériel génétique d'un individu ou d'une cellule. Elle peut être spontanée, causée par des agents naturels – exogènes ou endogènes –, ou induite, causée par des agents mutagènes – chimiques, physiques, ou biotechnologiques – appliqués en sélection variétale dans le but d'augmenter la variabilité génétique des plantes pour permettre la sélection de nouveaux caractères puis de variétés d'intérêt agronomique.

Pendant près d'un siècle, causée par des agents mutagènes physiques et chimiques, la mutagenèse induite n'a été qu'aléatoire, tout comme l'est la mutagenèse spontanée. Mais c'est seulement depuis

⁹ La composition du groupe de travail du CS est indiquée en Annexe 3.

¹⁰ Les modalités du travail préparatoire à l'avis du CS incluant le calendrier des réunions du groupe de travail du CS sont présentées en Annexe 3.

le développement de techniques de mutagenèse dirigée, par l'utilisation de nucléases dirigées comme celles à l'œuvre dans le système CRISPR-Cas9 permettant d'effectuer des mutations de manière ciblée dans le génome, que l'on qualifie désormais la mutagenèse non dirigée d'aléatoire.

Enfin, les techniques de mutagenèse peuvent être appliquées dans différents contextes et sur différents matériels. Elles ont initialement été appliquées *in vivo*, mais quand les techniques de culture *in vitro* se sont développées, les avantages inhérents au passage *in vitro* ont été exploités dans de nombreux processus, incluant la mutagenèse. Les chapitres suivants éclaireront les conditions particulières dans lesquelles il est intéressant d'appliquer des techniques de mutagenèse en conditions *in vitro* pour certaines espèces sur certains matériels végétaux. En l'occurrence, les techniques de mutagenèse peuvent être appliquées sur une grande variété de matériels végétaux *in vitro*, plus ou moins différenciés, plus ou moins structurés, qui couvrent aussi bien des cellules isolées que des plantes entières, en passant par des cals, des tissus ou des organes.

Ainsi, l'expression « cellules végétales cultivées *in vitro* » du projet de décret est équivoque. Il n'est pas clair de quelles cellules végétales il est question. Pour clarifier le périmètre couvert par cette expression, le groupe de travail suggère que cette définition soit réservée aux cellules isolées (ex : suspensions cellulaires, protoplastes (cellules dépourvues de leur paroi pecto-cellulosique), microspores (seules cellules naturellement isolées dans la plante)). L'interprétation du groupe de travail consistant à distinguer les cellules isolées par rapport aux autres types de matériels végétaux est également basée sur une propriété commune spécifique des cellules isolées soumises aux agents mutagènes, qui est d'éviter le chimérisme des tissus régénérés. L'état de cellules isolées en culture est toutefois transitoire et disparaît dès la première division de celles-ci pour former des amas cellulaires indifférenciés, plus ou moins compacts, désignés sous le terme de cals, ou des embryons. Le terme « cellules végétales » du projet de décret est donc difficile à définir de manière univoque. Une définition plus précise aurait été attendue dans le projet de décret.

Par sélection végétale, ou, expression plus usitée, sélection variétale, il faut entendre l'ensemble du processus d'amélioration des plantes (*plant breeding* en anglais). La création de variabilité génétique, par exemple par mutagenèse, en fait partie, ainsi que les étapes de sélection au sens strict du terme. Le groupe de travail considère que les techniques de sélection variétale les plus pertinentes à comparer aux techniques concernées par le décret sont les autres techniques de mutagenèse aléatoire et la culture *in vitro*.

Ainsi, le groupe de travail a traduit la question donnée par le bureau par la question sous-jacente suivante : « La mutagenèse aléatoire *in vitro* telle que définie par le projet de décret constitue-t-elle une technique à part entière, qui mériterait, pour une raison particulière, d'être traitée différemment des autres applications de mutagenèse aléatoire et des autres applications de culture *in vitro* considérées comme des méthodes conventionnelles de sélection variétale ? »

Une question supplémentaire, considérée importante à traiter dans le contexte de la saisine, est la suivante : « Dans quelle mesure et depuis quand la mutagenèse aléatoire *in vitro* est-elle utilisée en sélection variétale ? » Le groupe de travail s'est proposé d'apporter des éléments informatifs sur l'historique de l'application des techniques de mutagenèse aléatoire *in vitro*, en particulier sur cellules végétales au sens attribué au projet de décret.

1.6. Méthodologie de travail

Dans l'objectif de mettre en évidence les éventuelles spécificités des techniques de mutagenèse aléatoire appliquées *in vitro* à des cellules végétales, le groupe de travail a comparé, selon plusieurs critères :

- les techniques de mutagenèse aléatoire appliquées *in vitro* à des cellules végétales,
- les techniques de mutagenèse aléatoire appliquées *in vitro* à d'autres matériels végétaux,
- les techniques de mutagenèse aléatoire appliquées *in vivo*,

- les applications de la culture *in vitro* (en l'absence d'agents destinés à produire des mutations),

en faisant également référence aux mutations spontanées.

Un objectif associé était d'examiner la question d'une éventuelle interaction entre culture *in vitro* et mutagenèse aléatoire, et d'identifier d'éventuels éléments qui permettraient de tester cette hypothèse.

Pour augmenter la pertinence de son analyse et l'efficacité de son travail dans les délais impartis, le groupe de travail a fait appel à des chercheurs reconnus¹¹, sélectionnés pour leur expertise dans les domaines en lien avec la question posée, dont la biologie cellulaire.

La réflexion a été structurée par l'intermédiaire d'un tableau comparatif, visant essentiellement à clarifier les définitions des différentes techniques et matériels végétaux concernés, et définir puis affiner les critères de comparaison proposés selon leur pertinence pour mettre en évidence les éventuelles différences et points communs entre la mutagenèse aléatoire *in vitro* de cellules végétales et les autres techniques proposées. Deux critères de comparaison essentiels ont été retenus : la variabilité génétique et épigénétique induite et les phénotypes induits.

2. La mutagenèse en sélection variétale

2.1. Les différentes sources de variabilité génétique en sélection variétale

L'amélioration génétique d'un caractère dépend de l'efficacité des schémas de sélection visant le cumul d'allèles favorables *via* la recombinaison, de la qualité du phénotypage voire du génotypage, mais surtout de la variabilité génétique disponible. Des concepts, des méthodes et des outils de sélection de plus en plus élaborés ont été progressivement développés pour gagner en efficacité dans l'exploitation de la diversité génétique pour l'amélioration de caractères d'intérêt agronomique dont la génétique mendélienne, la génétique quantitative, la mutagenèse, la culture *in vitro*, la transgénèse, la génomique, les technologies de phénotypage, lesquelles ont fortement évolué ces dernières années.

Les mutations participent à la création de cette diversité génétique via des changements ponctuels ou structurels de la séquence d'ADN nucléaire ou cytoplasmique. Ces mutations concernent aussi bien les cellules somatiques que les cellules germinales. Les mutations spontanées (environ une mutation tous les 100 millions de paires de base à chaque génération, quel que soit l'organisme vivant¹² (Huang et al., 2016; Krasovec et al., 2019; Ossowski et al., 2010; Rahbari et al., 2016), sont provoquées par des erreurs de copie¹³ de l'ADN lors de la division cellulaire, des irradiations (UV, radiations cosmiques), des stress chimiques ou physiques, voire des attaques parasitaires (Cui et al., 2017; Lucht et al., 2002). Ces mutations ont contribué de façon significative aux longs processus d'évolution, de spéciation, de domestication et d'adaptation aux milieux et aux pratiques agricoles des espèces végétales cultivées. Ces mutations ont pu être sélectionnées naturellement ou sous la pression de sélection exercée par l'Homme en fonction des objectifs recherchés. Le génome d'une variété, même dite fixée, n'est donc pas figé mais évolue lentement dans le temps.

La diversité génétique présente dans une espèce sélectionnée est ainsi le résultat du long processus d'évolution et de sélection antérieure au sein de l'espèce. Le sélectionneur a accès en partie à cette diversité génétique via les centres internationaux de ressources génétiques, lesquels regroupent des

¹¹ Les chercheurs qui ont accepté de répondre à nos sollicitations dans les délais impartis sont indiqués en Annexe 3.

¹² Fréquence moyenne des eucaryotes, les bactéries ont des fréquences de mutation moindre.

¹³ Lors de la réplication un nucléotide non complémentaire du modèle peut être incorporé dans la séquence synthétisée, lors de la synthèse du deuxième brin, le nucléotide incorporé sera complémentaire de ce nucléotide et non identique à l'original.

accessions de variétés cultivées et d'écotypes sauvages. Le sélectionneur peut également chercher à introduire la diversité génétique présente dans les espèces apparentées sexuellement compatibles par hybridation interspécifique.

2.2. Les mutations induites par mutagenèse aléatoire

Dans certains cas, quand la diversité génétique accessible n'est pas suffisante dans l'espèce ou ses apparentés pour sélectionner un caractère donné, on peut induire de la diversité génétique par mutagenèse, l'objectif étant d'augmenter fortement la fréquence d'apparition de mutations contrôlant l'expression du caractère en comparaison à la fréquence de mutations spontanées (environ 1000 à 10.000 fois plus), ce qui facilite la sélection des caractères recherchés en réduisant fortement les effectifs à utiliser.

Les mutations sont généralement récessives, c'est-à-dire qu'elles ne confèrent pas un phénotype particulier à la cellule ou à l'individu qui les porte à l'état hétérozygote. La majorité d'entre elles sont d'ailleurs silencieuses car, même à l'état homozygote, elles n'induisent pas de modification du phénotype. A noter que la mutagenèse est efficace pour des caractères à déterminisme simple. Elle est moins pertinente pour des caractères polygéniques. Après sélection du mutant, ce dernier peut être valorisé directement ou être croisé avec du matériel élite en vue d'un transfert du nouveau caractère dans des variétés commerciales à bonne valeur agronomique.

2.3. Historique de la mutagenèse en sélection variétale

Les premiers travaux expérimentaux sur la mutagenèse physique réalisés en 1906 avec des rayons X ont porté sur le *datura* (Gager and Blakeslee, 1927), puis en 1928 sur le maïs et l'orge (Stadler, 1928). Après 1945, la technique se développe avec l'utilisation de particules nucléaires (rayonnements alpha, gamma avec le cobalt 60, protons...) (Gaul, 1961).

Les premiers travaux sur la mutagenèse chimique ont commencé un peu avant 1935 avec le gaz moutarde et ses dérivés (Auerbach, 1949). A la fin des années 50, H. Heslot et R. Ferrary (Heslot, 1961) découvrent les propriétés mutagènes de certaines substances chimiques dont le méthanesulfonate d'éthyle (EMS), très largement utilisé depuis en mutagenèse induite et dont l'action est plus douce.

Les techniques de mutagenèse ont été utilisées internationalement. En 2020, l'Agence Internationale de l'Énergie Atomique recensait plus de 3300 variétés issues de traitement mutagène (Base de données de mutants FAO/AIEA¹⁴ (FAO/IAEA, 2018)). Ces variétés ont été commercialisées pour au moins 175 espèces (Ahloowalia et al., 2004). Parmi les très nombreux exemples, on peut citer :

- le riz à grains allongés
- l'orge à paille courte
- le lin à faible teneur en acide linoléique
- le tournesol à forte teneur en acide oléique
- la laitue naine
- la pomme de terre pour la couleur de la peau
- la tomate résistante à certaines maladies
- le pamplemousse sans pépin
- le pommier pour le port de l'arbre
- le cerisier pour l'autofertilité
- le pêcher pour la couleur du fruit

¹⁴ Base de données de mutants MVD (*Mutant Variety Database*) d'un programme conjoint de la FAO et de l'AIEA : <https://mvd.iaea.org/>, consulté le 26 juin 2020.

- l'abricotier pour la précocité
- les plantes ornementales (forsythia, weigela, caryopteris, rosier, chrysanthème, azalée, lis...) pour l'architecture de la plante ou la couleur de la fleur.

Dès 2000 (McCallum et al., 2000), la technique de TILLING (*Targeted Induced Local Lesions In Genomes*) a été proposée pour sélectionner rapidement dans une banque d'ADN des descendants d'un génotype traité avec un agent mutagène, la mutation recherchée pour un gène contrôlant l'expression du caractère d'intérêt, simplement à partir de la séquence génique. Cette sélection génotypique est suivie d'une caractérisation phénotypique des mutants identifiés.

Depuis, de nouvelles technologies dont CRISPR-Cas9 se sont développées pour modifier de façon ciblée et possiblement dirigée la séquence nucléotidique d'un ou de plusieurs gènes. Celles-ci permettent de modifier le génome de variétés élites pour des caractères simples dont on connaît les déterminants génétiques, sans modifier le fond génétique et donc la valeur agronomique de ces plantes, diminuant le besoin de rétrocroisement par rapport aux techniques de mutagenèse aléatoire.

Ces nouvelles techniques permettent de réduire fortement les effectifs de plantes à phénotyper. Dans le cas d'une mutagenèse aléatoire sur graines, il faut manipuler plusieurs milliers de plantes, alors que le TILLING et CRISPR-Cas9 nécessitent de ne phénotyper que quelques plantes, à savoir les mutants identifiés sur la base de la séquence du gène pour le TILLING et les plantes directement modifiées pour CRISPR-Cas9.

3. La culture *in vitro* en sélection variétale

3.1. Les techniques de culture *in vitro*

La culture *in vitro* de végétaux regroupe l'ensemble des techniques qui permettent de cultiver dans des conditions axéniques (stériles) des organes, des tissus, des amas de cellules indifférenciées (ou cals), des cellules isolées ou des cellules débarrassées de leur paroi pecto-cellulosique (protoplastes). Ces explants ou produits d'explants sont cultivés dans des récipients (boîtes de Petri, tubes, flacons...) contenant un milieu de culture artificiel à base d'eau gélifiée ou non, de sels minéraux, de sucres métabolisables ou non et d'hormones végétales nécessaires à la multiplication des cellules, dans des chambres de culture où les conditions environnementales, notamment l'intensité lumineuse, la photopériode, la température et l'hygrométrie, sont contrôlées.

Il existe désormais une large gamme de techniques de culture *in vitro*, présentées succinctement en Annexe 4 : micropropagation, culture de méristèmes, embryogénèse somatique, sauvetage d'embryons, protoplastes, haplo-diploïdisation. Elles ont en commun d'aboutir à la régénération d'une plante entière à partir de cellules, de tissus ou d'organes végétaux.

3.2. Intérêts en sélection variétale

La culture *in vitro* de certains organes ou tissus permet de propager, indépendamment des saisons, certaines espèces végétales dans des espaces restreints (chambre de culture) avec un rendement, une qualité et une efficacité plus importante qu'en serre ou en pépinière, notamment pour des espèces comme les arbres fruitiers montrant une faible efficacité de multiplication végétative en pépinière. Ce mode de bouturage est utilisé pour de nombreuses espèces en horticulture et arboriculture notamment.

La culture *in vitro* de cellules isolées de différents tissus permet d'appliquer aux végétaux les techniques de microbiologie développées sur les organismes unicellulaires (bactérie, levures, algues).

Pour certaines espèces, il est possible d'obtenir la multiplication de ces cellules par divisions cellulaires clonales et d'orienter l'organogenèse des colonies ainsi formées afin de régénérer des plantes entières dont toutes les cellules sont dérivées de la cellule d'origine. Si la culture *in vitro* de cellules isolées (protoplastes notamment) a été peu utilisée *per se* en amélioration des plantes (hormis pour la fusion de protoplastes et la transformation génétique), l'androgenèse et la gynogenèse sont très employées. En effet, pour un grand nombre d'espèces cultivées (riz, blé, orge, maïs, colza, melon, carotte etc. – <https://www.gnis-pedagogie.org/sujet/biotechnologies-fixer-rapidement-nouveaux-caracteres/>), il est possible d'obtenir des embryons puis des plantes haploïdes à partir de culture *in vitro* d'anthers, de microspores, d'ovaires ou d'ovules, ce qui permet, après doublement chromosomique (qui se produit souvent spontanément), de « fixer » très rapidement à l'état homozygote le matériel génétique en cours de sélection. La majorité des variétés de colza cultivées actuellement sont dérivées de cette technique.

Le sauvetage d'embryons peut être utilisé pour transférer des caractères agronomiques d'intérêt entre espèces sauvages et cultivées. La fusion de protoplastes est utilisée pour le croisement entre deux espèces éloignées. Elle peut également permettre l'échange des génomes cytoplasmiques (mitochondries et chloroplastes) qui sont hérités par voie maternelle.

3.3. Historique de développement et exemples d'application en sélection variétale

L'histoire de la culture *in vitro* est marquée par différentes avancées scientifiques (Thorpe, 2012) dont quelques dates peuvent être brièvement rappelées. En 1902, Haberlandt étudie la notion de totipotence cellulaire, c'est-à-dire l'aptitude qu'ont les cellules végétales peu ou non différenciées à régénérer un individu complet identique à la plante mère (Haberlandt, 1902). Les premières expériences de culture *in vitro* de cellules végétales se développent grâce à l'utilisation d'une substance dont on venait de découvrir la nature, l'auxine, pour stimuler la prolifération de cellules végétales de carotte (Gautheret, 1939; White, 1939). Jusqu'en 1959, les travaux sont limités à la production de cals désorganisés; à cette date, Reinert met en évidence les possibilités d'embryogenèse somatique, processus qui permet *in vitro*, de régénérer, à partir d'une cellule somatique, une structure organisée morphologiquement comparable à un embryon zygotique (Reinert, 1959). En 1957, Skoog et Miller révèlent les effets de nouvelles substances de croissance végétales, les cytokinines, dont l'ajout au milieu de culture de tissus de tabac permet de régénérer des méristèmes *in vitro*, donc de bourgeons, puis des plantes (Skoog and Miller, 1957). Les techniques de culture *in vitro* ont été appliquées aussi bien à des plantes de grande culture, potagères, ornementales, fourragères qu'à des fruitiers ou la vigne (Augé et al., 1989).

C'est au début des années 1950 qu'est développée la culture de méristèmes, l'une des premières applications de la culture *in vitro*. Si elle permet d'obtenir une plante identique à la plante initiale, un intérêt majeur réside dans le fait qu'elle permet de régénérer des plantes indemnes de virus, et de s'assurer en particulier de l'absence de virus pathogènes dont la circulation est rapportée. D'abord appliquée à des plantes contaminées par plusieurs virus pour les éliminer (Morel and Martin, 1952), cette technique est largement utilisée en particulier chez les plantes qui sont multipliées végétativement, tels que la pomme de terre (Mellor and Stace-Smith, 1977) et le fraisier (Torres, 1989). Elle est particulièrement utile dans les zones tropicales dont les productions végétales sont souvent affectées par des virus; la culture de méristèmes est ainsi une technique majeure pour maintenir des productions saines de canne à sucre, de manioc, d'igname ou de bananier.

La culture d'embryons est une technique ancienne, mise au point par Hannig en 1904 (Hannig, 1904). Elle est très utile chez le tournesol où les phénomènes de dormance des graines sont particulièrement forts, pour accélérer les cycles végétatifs (Alissa et al., 1986). Elle permet d'obtenir quatre à cinq générations successives par an, au lieu d'une seule en culture normale, le cycle végétatif étant ramené à 80 jours. Le sauvetage d'embryons a été utilisé chez la tomate cultivée, *Solanum lycopersicon*. Du fait de son autogamie, la tomate possède une variabilité génétique faible.

En revanche, les tomates sauvages possèdent de nombreux gènes de résistance aux maladies. L'incompatibilité avec les espèces sauvages génétiquement les plus éloignées de la tomate cultivée peut être contournée grâce à la technique de sauvetage d'embryons (Kharkongar et al., 2013). D'autres plantes, telles que la laitue ou encore la courgette, ont bénéficié du sauvetage d'embryons pour améliorer la résistance aux virus et aux champignons pathogènes.

Quand une instabilité chromosomique est observée dans les embryons interspécifiques, la fusion de protoplastes peut permettre le croisement entre deux espèces éloignées. Les premières obtentions de protoplastes par filtrations successives (Bergmann, 1959) puis par digestion enzymatique de la paroi pecto-cellulosique (Cocking, 1960) datent des années 1960, et les premières plantes régénérées à partir de protoplastes ont été obtenues en 1971 (Takebe et al., 1971). En 1972, le premier hybride entre *Nicotiana glauca* et *Nicotiana langsdorfii* résultant d'une fusion de protoplastes est obtenu (Carlson et al., 1972). Cette technique a été appliquée à la pomme de terre cultivée, *Solanum tuberosum*. A partir d'espèces sauvages de pomme de terre originaires d'Amérique du Sud, la fusion de protoplastes a permis l'introduction de gènes de résistance à des pathogènes (Austin et al., 1985; Austin et al., 1988)

La fusion de protoplastes a été utilisée pour transférer à du colza le caractère d'induction d'une stérilité mâle, portée par le génome mitochondrial et découvert chez le radis (Pelletier et al., 1983).

La production d'haploïdes doublés par culture de microspores est appliquée à grande échelle par les sélectionneurs de colza pour produire des variétés de type lignée ('Goéland' inscrite au Catalogue¹⁵ en 1992, puis Pollen, ...) ou des parents d'hybrides F1. En 2015, selon une enquête de l'Académie d'Agriculture, 97 % des hybrides de colza étaient produits à partir d'haploïdes doublés obtenus après culture *in vitro* de microspores (Ricroch et al., 2018).

4. L'application *in vitro* de techniques de mutagenèse aléatoire

4.1. Quel intérêt en sélection variétale ?

Tout comme la mutagenèse induite *in planta* sur des apex ou des graines, la mutagenèse *in vitro* a pour but de créer de la variabilité génétique supplémentaire chez les individus qui en dérivent. Elle permet, dans un espace réduit, de mutagéniser (c'est-à-dire de soumettre à des agents mutagènes) tous types d'explants qu'il serait impossible de traiter et de bouturer *in vivo* (fragments d'organes par exemple). Pour les plantes à multiplication végétative, elle permet d'accéder à des sources d'agent mutagène physique en respectant les règles d'asepsie.

L'avantage essentiel, pour les espèces pour lesquelles il est possible d'isoler, de cultiver les cellules après mutagenèse et de régénérer les colonies qui en découlent en plante entière, est d'éviter le chimérisme des cellules de cette plante. En effet, chaque cellule d'une graine mutagénisée, par exemple, porte des mutations différentes dans son génome. La plante issue de cette graine sera donc une mosaïque de cellules portant ces différentes mutations. Ce n'est qu'à la génération suivante que ses descendants seront constitués de cellules portant les mêmes mutations (mais différentes entre descendants) car chacun d'eux sera issu d'une seule cellule œuf. Dans le cas des bourgeons, la mutagenèse conduit également à des chimères, la mutation pouvant affecter soit une cellule des couches superficielles de l'apex, soit une cellule plus interne. L'expression de la mutation au niveau de la plante dépendra donc de la couche cellulaire à laquelle appartient la cellule affectée par la mutation. Alors que dans le cas de la culture *in vitro* de cellules isolées mutagénisées, chaque

¹⁵ Catalogue Officiel français des espèces et variétés de plantes cultivées, de la responsabilité du Ministère chargé de l'Agriculture qui publie au Journal Officiel de la République Française les différents arrêtés relatifs à l'inscription et à la radiation des variétés sur propositions du Comité Technique Permanent de la Sélection des plantes cultivées (CTPS). Le Catalogue contient aujourd'hui plus de 9000 variétés pour 190 espèces.

plante, régénérée à partir d'une seule cellule, sera constituée de cellules portant toutes les mêmes mutations.

Dans le cas particulier de l'embryogenèse somatique de microspores, les plantes diploïdes obtenues après doublement chromosomique portent toutes les mutations à l'état homozygote, ce qui, dans le cas de mutations récessives, présente un très grand intérêt.

4.2. Historique de développement et exemples d'application en sélection variétale

La mutagenèse induite *in vitro* s'est développée, dans les années 1960-1970, à partir du moment où la culture *in vitro* de certaines espèces de végétaux a commencé à être maîtrisée. C'est essentiellement le gain en termes d'espace nécessaire pour traiter un grand nombre d'individus (cellules et entités pluricellulaires) et de temps qui motive ce genre d'approche. Elle peut être réalisée sur tous types de tissus ou organes et la base de données de l'AIEA/FAO, qui regroupe plus de 3300 variétés issues de mutagenèse, appartenant à de très nombreuses espèces différentes, dénombre une centaine de variétés ayant pour origine des individus issus de mutagenèse *in vitro*. Plus de la moitié d'entre elles ont d'ailleurs été obtenues avant l'année 2001¹⁶.

La recherche de mutation dominante ou semi-dominante, conférant à la cellule qui la porte un caractère facilement sélectionnable, est aussi facilitée par ce type d'approche. Par exemple, les variétés actuelles de colza résistantes aux imidazolinones sont dérivées de plantes obtenues par Swanson et al. après mutagenèse de microspores (Swanson et al., 1989). Ces microspores ont été traitées dans un premier temps avec un mutagène (le N-nitroso-N-éthylurée ou ENU) puis mises en culture afin d'induire l'embryogenèse, l'ajout ultérieur d'une imidazolinone permettant de sélectionner les embryons puis les plantules tolérantes à cet herbicide.

Mutagenèse *in vitro* de microspores de Brassica

La culture de microspores haploïdes de certaines espèces du genre *Brassica* est idéale pour réaliser de la mutagenèse du fait que des millions de microspores peuvent être isolées puis mises en culture en boîte de Petri et qu'elles présentent un taux de régénération très élevé. Les microspores viables après un traitement mutagène peuvent être régénérées directement en plantes et ensuite sélectionnées pour des caractères d'intérêt. Après doublement chromosomique (spontané ou par utilisation de colchicine) toute modification de l'ADN se retrouvera à l'état homozygote dans la plante, ce qui facilite l'identification de mutations récessives ou dominantes. A noter que les mutations létales ne peuvent être produites avec cette méthode puisque les microspores sont haploïdes. Différents agents mutagènes ont été utilisés avec succès sur des microspores de *Brassica* : EMS, ENU (N-nitroso-N-éthylurée), NaN₃ (azoture de sodium), MNU (N-nitroso-N-méthylurée), rayons gamma, rayons X et UV (Voir (Szarejko and Forster, 2007) pour une revue).

Il y a de nombreuses publications sur la création de lignées de *Brassica* modifiées pour des caractères agronomiques ou le profil en acides gras. A titre d'exemple, différents protocoles de mutagenèse *in vitro* de microspores avec l'EMS ont été appliqués sur le colza (*Brassica napus*), la navette (*B. rapa*) et la moutarde brune (*B. juncea*) par (Ferrie et al., 2008). Pour cette étude, plus de 80.000 plantes haploïdes ou haploïdes doublés de *Brassica* ont été produites. Une évaluation de la composition en acides gras des graines d'haploïdes doublés a mis en évidence des différences de teneur en acide oléique, acide linoléique ou en acides gras saturés entre lignées chez ces 3 espèces. Daurova et al. ont également isolé des mutants plus riches en acide oléique après traitement EMS de microspores de *B. rapa* (Daurova et al., 2020). Après traitement UV de microspores, les graines de plantes

¹⁶ La base de données de mutants de la FAO/AIEA n'est pas exhaustive mais on peut noter la fraction de mutants *in vitro* par rapport à l'ensemble des mutants de la base. Une analyse plus détaillée des mutants disponibles dans cette base de données est présentée en Annexe 5.

haploïdes doublées de colza ont présenté des modifications de la teneur en acides gras saturés (Beaith et al., 2005). De même des modifications de la teneur en acide érucique et en glucosinolates des graines de moutarde d’Ethiopie (*B. carinata*) ont été générées par traitement UV ou EMS (Barro et al., 2001, 2002).

Lu Y et al. ont traité *in planta* des boutons floraux de chou chinois (*B. rapa*) à l’EMS pour induire des mutations avant la mise en culture des microspores (Lu et al., 2016). Au total, 142 mutants présentant des variations de forme de feuille, de couleur de feuille et de fleur, de taille de la corolle, de date de floraison, et de résistance au mildiou ont été identifiés parmi 475 haploïdes doublés.

Chez le colza, la sélection *in vitro* combinée à un traitement UV a été utilisée pour identifier des mutants issus de microspores plus tolérants au froid. Après expérimentation au champ et en conditions contrôlées pour la résistance au froid, une lignée plus résistante a été sélectionnée par (McClinchey and Kott, 2008). De même, Janska et al. ont obtenu des plantes tolérantes au froid en sélectionnant *in vitro* pour la tolérance à la trans-4-hydroxy-L-proline (Janska et al., 2010). Douze haploïdes doublés ont été régénérés dont 3 présentaient une meilleure résistance au froid. Des lignées de colza plus résistantes à *Sclerotinia sclerotiorum* ont été produites en utilisant un protocole particulier combinant un traitement EMS et une sélection *in vitro* (Liu et al., 2005). Dans ce protocole, des cals ont été produits à partir de plantes haploïdes issues de culture de microspores. Ces cals ont été traités à l’EMS puis sélectionnés pour la résistance à l’acide oxalique, toxine produite par l’agent pathogène. Deux lignées régénérées des cals tolérants ont été sélectionnées pour un meilleur niveau de résistance dans des tests réalisés en serre ou au champ.

La sélection *in vitro* (sans utilisation de mutagène) ou combinée à la mutagenèse induite a également été utilisée pour la tolérance à un herbicide (Beverdors and Kott, 1987; Swanson et al., 1988; Swanson et al., 1989; Zhang and Takahata, 1999).

A noter qu’une sélection pour la teneur en acide érucique (Albrecht et al., 1995) ou en acide oléique (Möllers et al., 2000) a pu être réalisée sur des populations en ségrégation d’embryons issus de culture de microspores appliquées à des croisements F1 fort x faible.

5. En quoi la « mutagenèse aléatoire *in vitro* » telle que définie par le projet de décret se distingue-t-elle des autres techniques de sélection variétale sur le plan biologique ?

5.1. Comparaison en termes de variabilité génétique induite

5.1.1. Les mutations spontanées

Avant d’entrer dans les descriptions moléculaires de la variabilité génétique induite, il est important de rappeler que l’on entend par mutation tout événement de changement transmissible¹⁷ au sein d’une séquence d’ADN génomique, qu’il se traduise par un changement de phénotype ou non. La mutation est le produit de l’introduction d’une différence entre une séquence parentale et une séquence « fille ». Une fois introduites, les mutations sont soumises à une sélection.

Si la mutation se maintient à l’échelle d’une population, les différences observées sont appelées polymorphismes. La fréquence et le nombre des différences entre individus, sur l’ensemble du

¹⁷ Transmission : d’une génération à l’autre par reproduction, ou d’une cellule à une autre au cours des divisions cellulaires au sein d’une culture de cellules ou dans les tissus non gamétiques d’un individu tout au long de sa vie. Ce qui distingue les mutations germinales des mutations somatiques.

génomique, reflètent la variabilité génétique d'une espèce. Les mutations ne sont pas des erreurs, au sens où elles sont consubstantielles au vivant.

Les mutations surviennent à tous les moments de la vie d'une cellule, selon les mécanismes expliqués ci-après. Les mutations qui apparaissent dans les cellules germinales (à l'origine des gamètes) sont transmises à la descendance. Les mutations qui surviennent dans les cellules non germinales, sont appelées mutations somatiques. En règle générale, les mutations germinales sont moins fréquentes que les mutations somatiques – des mécanismes de réplication, de métabolisme et de contrôle de l'expression des transposons et virus plus importants ayant été sélectionnés dans les cellules germinales au cours de l'évolution (Parrilla-Doblas et al., 2019). Chez les plantes, la totipotence des cellules fait que des mutations somatiques peuvent être transmissibles à une descendance.

Trois étapes sont nécessaires à la survenue d'une mutation :

- 1) La première étape est une modification, d'une base, de la liaison de la base à son ose ou d'une liaison entre les nucléotides (base + ose) ou de l'insertion d'une séquence ou d'un réarrangement de séquence au sein ou entre des chromosomes. Selon les agents mutagènes responsables, les modifications sont de plusieurs types.

Il existe des agents dits exogènes, car ils sont apportés par l'environnement. Les rayonnements ionisants (X, Gamma...) introduisent préférentiellement des cassures entre nucléotides, sur un ou deux brins. Les rayons UV sont très actifs sur le plan chimique et introduisent des dimères de thymine. Certains virus, en s'intégrant dans le génome de cellules, introduisent de nouvelles séquences (Takahashi et al., 2019).

Les agents dits endogènes résultent de l'activité biologique de la cellule. La source majeure de mutations vient des anomalies d'incorporation lors de réplication sous forme de mésappariement (*mismatch*). En effet, bien que les enzymes de copie de l'ADN¹⁸ aient une spécificité élevée, il arrive qu'un nucléotide non complémentaire soit incorporé. Ces changements sont à l'origine de variations ponctuelles de séquence, mutations ponctuelles donnant les polymorphismes ponctuels (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP). De plus, les événements de recombinaison surviennent fréquemment lors des méioses, plus rarement lors des mitoses. Ils peuvent entraîner délétions, insertions, translocations, inversions... Enfin, les génomes contiennent plusieurs familles d'éléments répétés retrouvés en grand nombre d'exemplaires, beaucoup d'entre eux sont mobiles (transposons, rétrotransposons). Leur mobilisation, par divers facteurs, biotiques ou abiotiques, peut entraîner des mutations par insertion¹⁹.

- 2) Les modifications exposées ci-dessus peuvent être détectées par des protéines cellulaires spécialisées qui activent des systèmes de réparation. Pour chaque type de modification exogène ou endogène, un type de réparation est préférentiellement activé.

Ainsi, les rayonnements ionisants font intervenir la liaison d'extrémités sans homologie (*Non Homologous End Joining*, NHEJ), ou la recombinaison homologue (*Homologous recombination*, HR). Si, lors de la liaison par NHEJ, il y a perte, ajout de séquences, ou que les brins liés ne sont pas issus du même chromosome, une mutation apparaît. La recombinaison homologue produit des mutations par des mécanismes plus complexes. Les produits des dérivés d'oxygène sont réparés par des systèmes spécifiques. Deux familles de systèmes existent : réparation par excision de nucléotide (*Nucleotide Excision Repair*, NER), réparation par excision de base (*Base*

¹⁸ L'ADN des cellules végétales et animales est formé de deux brins associés l'un à l'autre par des liaisons spécifiques, par correspondance de base : C et G, A et T. Lors de la division d'une cellule, chacun des brins sert de modèle pour la formation de deux molécules de deux brins à partir d'une. La formation de « couples » A-G, ou C-T par exemple, au lieu de C-G ou A-T donne des mésappariements.

¹⁹ Comme certains virus (voir plus haut) auxquelles certaines sont apparentées. Notons aussi que ces séquences répétées sont aussi impliquées dans les recombinaisons.

Excision Repair, BER). Chacune de ces familles contient un très grand nombre de gènes. Après action de ces systèmes, les mutations peuvent apparaître si la base ou le nucléotide « réparé » ne peut s'apparier au nucléotide complémentaire. Les dimères de thymine sont réparés par le système BER. Les altérations introduites par les virus intégratifs n'ont pas de système de réparation à court terme, et sont maintenues et soumises à la sélection naturelle.

Pour les changements introduits par les voies endogènes, les erreurs de réplication activent le système de réparation de ces mésappariements (*Mismatch repair*, MMR). Ce système peut être mis en défaut. Dans ce cas, une nouvelle paire de nucléotides remplace l'originale, ce qui introduit donc une mutation. Pour les événements de recombinaisons, en général, aucun système ne répare ces modifications. La conséquence fonctionnelle de ces événements joue sur leur maintien. Si la cellule est très perturbée, une mort cellulaire l'élimine. Si l'altération est moins importante, elle persiste. Il en est de même pour la mobilisation de séquences endogènes.

- 3) Après introduction de l'une des formes de changement exposées ci-dessus, s'il n'y a pas retour à la séquence initiale lors de la phase de réparation, on parle de *mutation*, ce qui correspond à la « fixation » du changement, quel qu'il soit. La fixation correspondant à la capacité de transmission du changement aux cellules filles de la cellule mutée.

Selon l'environnement d'une cellule, son activité métabolique, son type et le stade de développement de l'individu qui la porte, chacune des voies de modification et de réparation de l'ADN a une importance quantitative et fonctionnelle différente. Ainsi, la variation somaclonale (voir ci-après) résulte avant tout de mutations par les voies endogènes, les milieux de culture changent le métabolisme (ROS) et la croissance des cellules.

Enfin, une sélection naturelle peut s'opérer sur les organismes porteurs de ces mutations, résultant en leur maintien ou leur extinction. Ainsi, les cellules ayant acquis de nombreuses mutations entrent parfois dans un processus de mort dite programmée. Une fois introduites, fixées, les mutations subissent ou pas une sélection. Cette sélection dépend à la fois de l'environnement et des caractéristiques des mutations. Les modèles de sélection montrent qu'une grande partie des mutations est neutre ou d'impact négatif (Schultz et al., 1999), leurs effets peuvent se révéler en régime de fort coefficient de consanguinité, à l'extrême après un cycle d'haplo-diploïdisation. C'est cette sélection qui maintient ou non ce qui est désormais appelé la variabilité génétique de la population, ou degré de polymorphisme génétique.

On notera que la spéciation est un phénomène qui se déroule sur un temps long et met en jeu des facteurs environnementaux et génétiques. C'est la combinaison d'un nombre important de mutations qui favorise cette transformation. Parmi les mutations importantes dans l'évolution, le changement de structure des chromosomes (nombre, organisation moléculaire) est une étape clé.

5.1.2. Les mutations induites par mutagenèse aléatoire

Les mutations induites par mutagenèse aléatoire sont le résultat de l'application d'agents mutagènes physiques ou chimiques.

Parmi les agents mutagènes physiques, rayons X et γ , neutrons rapides et hadrons sont les agents mutagènes les plus utilisés (90 % environ pour le riz (Viana et al., 2019)). Les rayons X et γ sont des photons de haute énergie. Les rayons γ induisent préférentiellement de petites délétions et insertions, par cassures double brin de l'ADN (Viana et al., 2019). Ils peuvent aussi générer de plus importantes délétions, inversions et des cassures et réarrangements de chromosomes (Viana et al., 2019). Les rayons X provoquent la formation de ROS et induisent donc des mutations par modification de base, donc préférentiellement des mutations ponctuelles (Tan et al., 2019). Les neutrons rapides induisent préférentiellement des cassures de l'ADN et entraînent, des substitutions (mutations ponctuelles), des duplications, des insertions et des délétions (Lemay et al., 2019). Les systèmes de rayonnement hadrons (*Ion Beam Radiation*) produisent des protons et des ions carbone de haute énergie qui induisent principalement de grandes délétions mais aussi des variations

ponctuelles (Viana et al., 2019; Yang et al., 2019). A titre d'exemple, les fréquences observées pour les agents physiques sont variables selon les énergies déployées : rayons X et γ environ 10/Mb (Viana et al., 2019) ; neutrons rapides 30-80/génome pour le riz (Viana et al., 2019) et IBR peu de données.

Concernant les agents chimiques, les trois principaux agents sont : le méthanesulfonate d'éthyl (EMS), le N-nitroso-N-méthylurée (MNU) et l'azoture de sodium (AS). Ces molécules induisent des modifications des bases des nucléotides, ce qui, lors d'un cycle de réplication, sera associé à l'introduction de mutations ponctuelles (Serrat et al., 2014; Shirasawa et al., 2016; Viana et al., 2019). Selon la dose utilisée et le temps d'exposition, le nombre de mutations qu'il est possible d'obtenir varie (Viana et al., 2019). De même, pour la majorité des agents, le contexte de séquence et la méthylation de l'ADN ont une influence sur les mutations observées (Henry et al., 2014; Kim, 2019). Ainsi, la culture cellulaire, en modifiant le contexte chromatinien peut modifier la fréquence de certains des profils que l'on peut obtenir. D'une façon générale, les protocoles sont adaptés pour combiner efficacité de mutagenèse et moindre toxicité, afin de pouvoir sélectionner plus de mutants. Ces agents peuvent aussi induire des réarrangements chromosomiques, à de plus faibles fréquences. A titre d'exemple, les fréquences de mutations observées pour le riz selon les agents sont : pour l'EMS, 2 à 10/Mb (Mb : 10^6 pb) ; pour le MNU, 1/135kb (kb 10^3 pb) et pour l'AS, 1,4-2,9 /Mb (Viana et al., 2019).

On peut aussi faire appel, de façon plus rare et selon les espèces, à d'autres agents mutagènes (Diepoxybutane, N-nitroso-N-éthylurée (ENU)...).

Ces différents agents peuvent être utilisés en combinaison, notamment rayons γ et EMS par exemple. L'utilisation de systèmes de transposons et d'intégration de l'ADN-T a été décrite également. Notons enfin que le système CRISPR/Cas, connu pour sa capacité à induire des mutations ciblées, peut également permettre d'induire des mutations aléatoires dans des régions localisées, selon un protocole particulier d'utilisation, ce qui permet pour un gène donné de créer de la variabilité allélique (Li et al., 2020).

Les différents agents ayant des cibles moléculaires différentes les unes des autres, les profils de mutations sont différents, avec des recouvrements néanmoins, ce qui permet d'obtenir différents phénotypes (Belfield et al., 2012; Shirasawa et al., 2016; Viana et al., 2019).

S'il est observé des spécificités de modifications (les agents ionisants étant associés à plus de cassures chromosomiques, par exemple), les modifications observées pourraient aussi être apparues en conditions naturelles. Il est noté que les conditions environnementales (stress biotique ou abiotique) modifiant l'organisation de la chromatine, les fréquences auxquelles un gène particulier peut être modifié sont variables.

5.1.3. Les variations somaclonales en culture *in vitro*

C'est en 1971 que la présence de variants morphologiques de plantes de canne à sucre produits *in vitro* est publiée pour la première fois (Heinz and Mee, 1971). Le terme de « variation somaclonale » est quant à lui choisi par Larkin et Scowcroft en 1981 pour désigner les variants observés dans les cultures de cellules ou de tissus. Le terme de « variation somaclonale » désigne donc les variations génétiques et épigénétiques résultant de l'impact de la culture *in vitro* sur le matériel végétal. L'apparition de variations somaclonales peut être un obstacle lorsque l'on veut produire des individus génétiquement conformes à un individu de départ. Elle peut être également, lorsque la variation somaclonale est transmise de façon stable à la descendance (cas de mutations et, moins fréquemment, de modifications épigénétiques), une source de variabilité complémentaire à la variabilité naturelle ou à celle induite par mutagenèse, augmentant ainsi la probabilité d'apparition de caractères agronomiques intéressants.

La régénération de plantes *in vitro*, en particulier après passage par culture de cellules et de cals, donne naissance à un large spectre de variations somaclonales telles des modifications d'architecture, de résistance à des pathogènes, de tolérance à des stress abiotiques ou de rendement (Augé et al., 1989; Bairu et al., 2011; Krishna et al., 2016). Si des variants apparaissent de façon spontanée, des sélections *in vitro* sont parfois possibles à un stade précoce de culture, grâce par exemple à l'utilisation de milieux contenant des filtrats de pathogènes (champignons ou bactéries), des herbicides, de fortes concentrations de sel ou de métaux, et l'application de pH spécifiques. Des régimes thermiques particuliers, froid, chaud, alternance brutale de températures, pourront également être appliqués lors de la culture *in vitro*. La sélection pour un caractère monogénique sera cependant plus facile par cette approche que pour celle visant des caractères complexes régulés par plusieurs gènes. Parfois, les altérations phénotypiques observées en culture *in vitro* ne seront pas retrouvées au stade de la plante cultivée.

De nombreux facteurs vont contribuer à la fréquence d'apparition des variations somaclonales. Tout d'abord, l'espèce végétale étudiée. Par exemple, dans la famille des solanacées, une large gamme de variations somaclonales est observée chez la pomme de terre et la tomate. La nature de l'explant initial cultivé *in vitro* est également un facteur majeur dans l'apparition des variations somaclonales (Bairu et al., 2011; Krishna et al., 2016). Elles seront plus fréquentes dans des tissus très différenciés comme les racines, les feuilles et les tiges, que dans les explants où préexistent des méristèmes comme les bourgeons axillaires et les méristèmes apicaux. Il faut également noter que des variations somaclonales sont observées aussi bien après culture *in vitro* de tissus somatiques que de tissus gamétophytiques (San and Dattée, 1985). D'autres facteurs tels que l'âge des explants ou des tissus, la méthode de régénération directe ou indirecte après une étape de callogenèse, la durée et le nombre de cycles en culture *in vitro* du matériel végétal, contribueront également à la fréquence d'apparition des variants somaclonaux (Bairu et al., 2011).

Si certaines publications présentent des chiffres évaluant la fréquence d'apparition des variations somaclonales, il faut les analyser avec prudence, car les données sont souvent basées sur des observations de changements phénotypiques et physiologiques, et non sur des analyses fines visant à rechercher les modifications génomiques. Les données font néanmoins apparaître que la fréquence de variation somaclonale est en général supérieure à celle des mutations spontanées, en particulier pour les plantes régénérées à partir de cultures cellulaires.

Si la culture *in vitro* est une méthode performante pour la propagation de matériel végétal, elle est source de modifications métaboliques et de stress exercés sur les cellules et les tissus. Les conditions trophiques (faible luminosité insuffisante pour la photosynthèse, qui imposent la fourniture d'énergie sous forme de sucres, présence de substances de croissance – sels minéraux, hormones – en concentration non spécifiquement adaptée à la physiologie des tissus en culture), et environnementales (humidité saturante, récipients hermétiques...) particulières liées à la culture *in vitro* mobilisent les mécanismes naturels d'adaptation des plantes à leur environnement. On sait maintenant que ces mécanismes peuvent induire un ensemble de modifications des régulations du fonctionnement du génome, de type génétique (activation de transposons et rétrotransposons, aneuploïdie ou polyploïdie) et épigénétique (acétylation, méthylation ou dé-méthylation des histones, ou de méthylation de certaines bases de l'ADN) (Hsu et al., 2018; Kaeppler et al., 2000; Miguel and Marum, 2011; Smulders and de Klerk, 2011; Stelpflug et al., 2014; Stroud et al., 2013).

Les variations somaclonales sont donc le résultat de modifications génétiques et épigénétiques dont la fréquence d'occurrence est augmentée par la culture *in vitro*. Sur le plan biochimique, elles résultent de changements qui sont de même nature que les mutations spontanées et les mutations induites *in vivo* ou *in vitro*.

5.1.4. Existe-t-il une spécificité de la variabilité génétique induite par mutagenèse aléatoire appliquée *in vitro* par rapport à celle induite par mutagenèse aléatoire appliquée *in vivo* et par culture *in vitro* ?

Qu'elle soit appliquée *in vitro* comme *in vivo*, la mutagenèse induite augmente la fréquence des lésions de l'ADN par rapport à la fréquence des lésions induites dans les conditions naturelles, ce qui augmente la fréquence de mutations par rapport à celle observée spontanément. La culture de cellules ou de tissus, surtout sur des temps longs et dans un état indifférencié et dans les conditions particulières imposées par la culture *in vitro*, peut conduire à une accumulation de mutations spontanées et entraîner des mécanismes d'adaptation épigénétique. Mais les mécanismes de réparation de ces lésions qui sont à la source des mutations observées sont identiques entre les cellules cultivées *in vitro* ou les cellules *in vivo*. Pour un agent mutagène donné, les types de modifications sont les mêmes mais la fréquence de chacun des types peut varier selon les conditions.

5.1.5. Existe-t-il une spécificité de la variabilité génétique induite par mutagenèse *in vitro* de cellules végétales par rapport à celle induite par mutagenèse *in vitro* d'autres matériels végétaux ?

La mutagenèse induite de cellules végétales isolées *sensu stricto* a été très peu utilisée. Dans l'immense majorité des cas, ce sont des tissus ou des organes qui sont soumis à l'agent mutagène avant d'en isoler les cellules, dans le but notamment d'éviter le chimérisme génétique des plantes. En fonction de leur tissu d'origine et du moyen d'obtention, ce sont des cellules entières, des protoplastes (de mésophylle par exemple) ou encore des microspores (issues d'anthers). L'état de « cellules isolées » est très fugace car une fois mises en culture, celles-ci se divisent rapidement pour former des colonies (cals) puis des bourgeons ou des embryons qui pourront redonner des plantes entières. Si le phénotype que l'on recherche est sélectionnable à un stade précoce (microcolonies par exemple), il est aisé de soumettre un très grand nombre (des millions) d'individus à ce crible dans un espace restreint, ce qui permet de sélectionner plus facilement des événements rares.

Dans les rares cas où les cellules isolées sont la cible directe de l'agent mutagène, on peut penser que le traitement sera plus efficace puisque les cellules sont moins protégées qu'au sein d'un tissu mais ici encore, c'est la fréquence des mutations qui sera plus élevée, la nature des mutations obtenues restant la même.

5.2. Comparaison en termes de phénotypes induits

5.2.1. Spécificités des différentes techniques de mutagenèse dans l'induction de phénotypes

La spécificité des techniques de mutagenèse dans l'induction de phénotypes résulte avant tout des conditions de criblage, de sélection des événements de mutation et non de la typologie des phénotypes potentiellement générés. La facilité de sélection des mutants dépend du taux de multiplication à chaque génération de l'espèce (espèces prolifères plus favorables) et du crible qui peut être mis en place : simple, comme la résistance à une substance synthétique ou naturelle ou une caractéristique visuelle telle que la taille, la couleur ; ou complexe, comme une augmentation du rendement ou une résistance quantitative à une maladie. Les modalités de traitement affectent également la facilité de détection des phénotypes recherchés : présence de chimères (mutagenèse *in vitro* sur tissus, organes ou *in vivo*) ou non (cultures de protoplastes ou de microspores) ; mutations à l'état hétérozygote (*in vitro* sur tissus ou organes diploïdes) ou homozygote (sur microspores *in vitro* avec régénération).

Le groupe de travail a cherché à faire une analyse statistique des phénotypes induits par les différentes techniques de mutagenèse, mais il n'a pas identifié de ressources appropriées. Quelques données clés montrent que la base de données de mutants de l'AIEA/FAO, alimentée sur une base

volontaire, n'est ni exhaustive, ni représentative, et particulièrement non pertinente pour une analyse en lien avec les phénotypes de tolérance à des herbicides (seulement 4 mutants avec le caractère de tolérance à des herbicides sur les 3332 mutants de la base). L'analyse est décrite en Annexe 5. Si la base ne peut être exploitée en termes statistiques, elle peut toutefois être intéressante comme ressource pour identifier des exemples de mutants des différentes catégories.

Quelques exemples :

- Gènes de nanisme

La révolution verte à partir des années 60 a reposé sur l'utilisation de gènes de demi-nanisme présents spontanément chez le blé ou le sorgho mais induits par mutagenèse sur graines chez l'orge, le riz et le colza. Ce caractère a eu un fort impact économique pour le blé (rendements multipliés par 4 en Inde, entre 1966 et 1986) et le riz (doublement des rendements en Indonésie entre 1969 et 1989). Des colzas nains issus de mutagenèse par EMS sur graines ont été inscrits au Catalogue Officiel français des espèces et variétés de plantes cultivées dès 1999. Ce caractère de développement ne pouvant être appréhendé *in vitro*, la mutagenèse *in vitro* n'a pas été envisagée spécifiquement.

- Gènes impliqués dans la composition en acides gras de graines d'oléagineux

Afin de répondre à la demande des nutritionnistes, les sélectionneurs de plantes oléagineuses ont été amenés à modifier la composition en acides gras de certaines huiles. Des variétés de colza à faible teneur en acide érucique ont ainsi été créées à partir d'un mutant spontané sans acide érucique, alors que les variétés cultivées en France jusqu'en 1972 produisaient une huile contenant environ 50 % de cet acide gras (caractère contrôlé par deux gènes). Par contre, faute de diversité présente dans l'espèce, deux cycles de mutagenèse sur graines ont été réalisés successivement pour obtenir des huiles de colza plus adaptées à l'utilisation en friture, à faible teneur en acide linoléique puis à haute teneur en acide oléique (plus de 75 % vs 60 %). La recherche de mutants a été réalisée en analysant la composition en acides gras de plusieurs milliers de descendances M2. De même que pour le nanisme, ce caractère de développement de la graine ne pouvant être sélectionné *in vitro*, la mutagenèse *in vitro* n'a pas été envisagée spécifiquement, en dehors des travaux de (Albrecht et al., 1995) sur l'acide érucique et de (Möllers et al., 2000) sur l'acide oléique, lesquels ont analysé la composition en acides gras d'un des deux cotylédons de l'embryon prélevé *in vitro*, avant régénération de la plante.

- Gènes impliqués dans les caractères de développement de plantes ornementales

La mutagenèse *in vivo* a été très souvent utilisée sur de nombreuses espèces ornementales (Chrysanthème, œillet, pétunia, rose, glaïeul, hibiscus...). Cependant, les contraintes d'asepsie imposées pour l'application de traitements mutagènes physiques en milieu hospitalier²⁰ et la forte capacité de régénération des tissus de certaines espèces ont incité les sélectionneurs à appliquer la mutagenèse *in vitro* à différentes espèces ornementales (chrysanthème, dahlia, caryopteris, chèvrefeuille...). Les tissus concernés ne sont jamais des cellules isolées mais toujours des tissus ou cals aptes à la régénération : bourgeons, tiges, pétales, lignées de cals embryogènes (embryons somatiques non issus de fécondation). Ces deux approches conduites *in vivo* ou *in vitro* ont pu être appliquées sans distinction, dans la mesure où la sélection est effectuée *in planta* et non *in vitro*, afin de modifier :

- des caractères floraux (couleur, taille et morphologie de la fleur, parfum) ;

²⁰ En France, les services de radiothérapie et de transfusion sanguine disposent des seules sources de radioactivité accessibles aux laboratoires de recherche.

- l'architecture ou le port de la plante (compacité, ramifications) ;
- le feuillage (panachure par exemple) ;
- caractères physiologiques (stress biotiques ou abiotiques, précocité de floraison).

En 2012, 719 plantes ornementales issues de mutagenèse aléatoire étaient recensées dans la base de données de la FAO/AIEA. A noter que, chez certains genres tel que le genre *Rosa*, les bourgeons axillaires ont une propension particulière à muter, donnant naissance à des rameaux porteurs de mutations. Cette caractéristique est très utilisée en sélection variétale.

- Gènes impliqués dans les caractères de développement de fruitiers

Les espèces fruitières sont le plus souvent des espèces pérennes reproduites de façon clonale par voie végétative. La majorité d'entre elles sont également allogames et présentent un taux élevé d'hétérozygotie. Dans ce contexte, la mutagenèse est une méthode d'amélioration variétale très appréciée car elle permet de corriger ponctuellement un défaut chez une variété de bonne valeur commerciale, sans en altérer l'ensemble des caractéristiques agronomiques. L'identification de mutants spontanés présentant un phénotype visuel (coloration du fruit, date de maturité, port de l'arbre) est d'ailleurs fréquemment réalisée par les pépiniéristes, et le nombre de demandes d'inscription au Catalogue de ce type de variétés est élevé.

La base de l'AIEA, qui recense uniquement les variétés issues de mutagenèse induite, compte en 2017 plus de 80 variétés de 27 espèces fruitières différentes, issues de mutagenèse induite depuis 1963. Dans presque tous les cas, c'est le mutant direct qui a été inscrit pour conserver les qualités agronomiques de la variété d'origine. Seulement 4 cas de croisements existent, en pommier et en cerisier. La très grande majorité de ces variétés a été produite par irradiation gamma de bourgeons *in vivo* (dormants ou non), suivie de plusieurs étapes de greffage pour assurer la déchimérisation. Dans quelques cas, des rayons X ou des neutrons rapides ont été utilisés. Les agents mutagènes chimiques ont été peu utilisés car leur pénétration dans les bourgeons dormants est difficile. Il existe également quelques cas isolés de variétés issues de traitements mutagènes sur graines ou sur pollen. Le pommier, le cerisier et le groupe des *Citrus* comptent le plus grand nombre de variétés issues de mutagenèse induite. Les caractères agronomiques améliorés chez ces variétés sont très variés : coloration et taille des fruits, date de maturité, port de l'arbre (en particulier port compact ou nain), parthénocarpié, autofertilité, et dans quelques cas résistance aux maladies.

De nombreux travaux de recherche ont porté sur la mutagenèse *in vitro* d'espèces fruitières depuis les années 1980. En effet, la possibilité de régénérer par néoformation de bourgeons ou par embryogenèse somatique à partir d'un nombre réduit de cellules permet de s'affranchir des étapes laborieuses de déchimérisation nécessaire pour pouvoir inscrire une variété stable. La possibilité d'effectuer une pression de sélection en culture *in vitro* pour la tolérance à des stress biotiques ou abiotiques a également été testée. Les espèces fruitières étant récalcitrantes à la régénération à partir de cellules isolées ou de protoplastes, les tissus traités sont généralement des feuilles ou des entre-nœuds de plantes *in vitro*. Malgré ces nombreuses publications, seulement 4 variétés issues de mutagenèse *in vitro* ont été inscrites (bananier et cerisier). A noter également l'inscription de 5 variants somaclonaux de fraisier, issus de différentes étapes de culture *in vitro* (méristèmes, culture d'anthères, cals...) sans application de traitements mutagènes.

- Gènes de résistance aux imidazolinones

Afin d'améliorer les conditions de désherbage de certaines espèces de grande culture, des variétés résistantes à des herbicides de post-levée à large spectre d'action ont été sélectionnées à partir de mutants. On trouve dans la littérature de nombreux exemples de résistance obtenus spontanément au champ ou induits par mutagenèse. Dans le cas des résistances aux imidazolinones, deux mutants spontanés ont été identifiés au champ chez le tournesol et un chez le colza (Hu et al., 2015), un mutant de colza a été isolé à partir d'une culture de protoplastes en l'absence d'agent mutagène

(donc non couvert pas le projet de décret), de même un mutant de betterave et de chicorée à partir de cultures cellulaires ainsi qu'un mutant de maïs à partir de cals (*idem*). La mutagenèse sur graines (entités pluricellulaires, non couvertes par le projet de décret) a permis de créer des variétés résistantes de tournesol, de riz et de blé ; la mutagenèse sur pollen (entité pluricellulaire, non couverte par le projet de décret) des variétés résistantes de maïs ; la mutagenèse *in vitro* de microspores (couverte par le projet de décret) des variétés résistantes de colza (2 mutations récessives). Contrairement aux exemples de phénotypes précédents, la sélection pour la résistance à l'herbicide a pu être réalisée *in vitro*, d'où le choix de cette technique, dans la mesure où la régénération de plantes adultes était maîtrisée. La culture *in vitro* avait l'avantage de sélectionner des mutants sur des effectifs très importants (1 milliard de cellules) dans un espace réduit.

5.2.2. Existe-t-il des phénotypes particuliers résultant d'une mutagenèse aléatoire *in vitro* par rapport aux phénotypes résultant d'une mutagenèse aléatoire *in vivo* ou à un processus de sélection impliquant une culture *in vitro* ?

Les mécanismes biochimiques sous-jacents à l'induction de mutations étant les mêmes pour les mutations spontanées, pour la mutagenèse (*in vivo* ou *in vitro*) et pour la culture *in vitro* (variations somaclonales), on doit s'attendre à produire potentiellement les mêmes types de variants génétiques, et par conséquent phénotypiques, quelle que soit l'approche. Le choix d'appliquer la mutagenèse dépend au départ de la diversité présente et accessible spontanément dans l'espèce et ses apparentées. L'existence d'un mutant avéré pour le caractère d'intérêt dans les collections de ressources génétiques n'incitera pas à se lancer dans la recherche coûteuse de mutants induits, à moins de l'intérêt d'en élargir la base génétique. Le choix d'appliquer la mutagenèse *in vitro* dépendra entre autres i) du caractère recherché et de la possibilité, dans certains cas, de le sélectionner *in vitro*, ii) de l'espèce et de son aptitude à la régénération à partir d'explants, de cals ou de cellules isolées, iii) des conditions d'utilisation des sources de rayonnement dans le cas d'une mutagenèse physique (centres hospitaliers). Il faut souligner qu'il est possible d'utiliser la mutagenèse *in vitro* sans opérer de sélection *in vitro* : des plantes entières sont régénérées après application de l'agent mutagène *in vitro* et les mutants sont sélectionnés ensuite (cas des plantes ornementales en particulier).

5.2.3. Existe-t-il des phénotypes particuliers résultant d'une mutagenèse aléatoire *in vitro* de cellules végétales par rapport aux phénotypes résultant d'une mutagenèse aléatoire *in vitro* d'autres matériels végétaux ?

La mutagenèse aléatoire *in vitro* de cellules végétales a été étudiée dès 1974 sur le tabac (Mondeil, 1974). Des plantes haploïdes régénérées à partir de microspores (culture d'anthers) traitées avec des rayons gamma présentaient des mutations pour des caractères morphologiques ou de couleur de fleur. Comme cité précédemment, cette technique a été utilisée pour sélectionner des mutants résistants aux imidazolinones chez le colza après traitement mutagène. Il faut rappeler également que de telles mutations ont été obtenues spontanément chez le colza à partir de cultures de protoplastes et, chez la betterave, à partir de cultures cellulaires. La mutagenèse *in vitro* de cellules végétales présente l'intérêt de ne pas produire de chimères. L'application de cette technique à des microspores a l'avantage de permettre de régénérer, après sélection des plantes homozygotes, aussi bien pour des mutations dominantes que des mutations récessives.

Le colza Clearfield résistant aux imidazolinones (Swanson et al., 1988; Swanson et al., 1989) cultivé au Canada dès 1995 représentait environ 20 % des surfaces soit 1 Million d'ha, en 2000 et 2001²¹ (Tan et al., 2005). En France, les variétés de colza Clearfield introduites plus récemment couvrent moins de 3 % des surfaces en colza, soit moins de 30.000 ha. En comparaison, les variétés de tournesol

²¹ Les surfaces cultivées en colza Clearfield au Canada ont ensuite notablement diminué au profit des variétés de colza transgéniques tolérantes au glyphosate et au glufosinate.

tolérantes aux imidazolinones représentent environ 25 % des surfaces de tournesol, soit 150.000 ha. Les variétés de colza Clearfield cultivées en France sont inscrites au Catalogue européen. Il n'y a pas de variétés de ce type inscrites en France en liste A. L'utilisation de ces variétés est conseillée principalement pour contrôler l'orobanche en conditions d'infestation modérée ou pour un désherbage en post-levée (forte pression de géraniums et de crucifères).

La résistance aux herbicides inhibiteurs de l'acétolactate synthase (sulfonylurées, imidazolinones)

L'acétolactate synthase (ALS) est une enzyme présente chez les végétaux, qui permet la synthèse des acides aminés ramifiés (valine, leucine, isoleucine). Des mutations dans le gène codant cette enzyme, qui aboutissent au changement d'un seul acide aminé de cette protéine, suffisent à la rendre insensible à des herbicides inhibiteurs de l'ALS tout en conservant sa fonctionnalité. A titre d'exemple, il suffit de changer une proline (CCT,CCC,CCA,CCG) en glutamine (CAA,CAG) en position 197 (donc ne changer qu'une seule base azotée) de l'acétolactate synthase d'Arabidopsis pour acquérir la résistance au Chlorsulfuron (Haughn et al., 1988; Jander et al., 2003). Il est donc relativement facile, en conditions de mutations spontanées, au champ, de sélectionner des adventices résistantes à ces herbicides si l'on exerce une pression de sélection forte et continue. C'est la raison pour laquelle ce type d'herbicides ne devrait pas être utilisé sur de grandes surfaces de culture de façon continue (tous les ans).

On notera que les mutations de cibles obtenues par mutagenèse causent les mêmes changements d'acides aminés que les mutations qui apparaissent spontanément et sont sélectionnées chez les adventices (voir la liste et les profils de résistance sur le site Internet de référence [weedscience.org](http://www.weedscience.org/Pages/MutationDisplayAll.aspx), <http://www.weedscience.org/Pages/MutationDisplayAll.aspx>).

De même que précédemment, les mécanismes biochimiques sous-jacents à l'induction de mutations par mutagenèse aléatoire *in vitro* étant les mêmes que pour les mutations spontanées, pour la mutagenèse *in vivo* ou *in vitro* d'entités pluricellulaires et pour la culture *in vitro* (variations somaclonales), on doit s'attendre à produire potentiellement la même diversité génétique, et donc phénotypique, quelle que soit l'approche.

5.3. Y a-t-il une interaction entre mutagenèse aléatoire et culture *in vitro* ?

Considérant que les mécanismes moléculaires en jeu sont identiques pour la mutagenèse *in vitro* et *in vivo*, il est attendu que les mêmes types de mutations seront produits. Les phénotypes que l'on pourra sélectionner par mutagenèse *in vitro* de cellules végétales en comparaison à la mutagenèse spontanée et aux autres techniques de mutagenèse seront donc identiques. Les fréquences auxquelles un gène peut être modifié sont en revanche variables selon la technique (agent, temps d'exposition, culture). Selon les phénotypes recherchés, l'identification de la variation d'expression du phénotype sera facilitée par la culture *in vitro* par rapport à une mutagenèse *in vivo*, notamment si la variation obtenue peut être sélectionnée lors de la phase de culture *in vitro* par l'application, sur de très grands effectifs traités, d'une pression de sélection. Cela concerne néanmoins de rares caractères, exprimés lors de la culture et sensibles à un agent de sélection. La culture *in vitro* ne fait donc que faciliter la détection et la stabilisation de phénotypes à partir de cellules ayant subi une mutagenèse chimique et physique sans qu'il y ait une interaction particulière entre mutagenèse induite et statut *in vitro* de la cellule. L'effet additionnel de la variation somaclonale est difficile à préciser. Les mutations seront de nature tout à fait comparable à celles dérivant de la mutagenèse *in vivo*.

6. Remarques complémentaires

Le Comité scientifique du HCB note qu'il aurait été possible d'élargir la question posée en s'intéressant à une éventuelle spécificité de l'impact environnemental potentiellement associé aux mutants concernés par le projet de décret.

Les impacts environnementaux sont associés aux caractères exprimés. Si la technique de mutagenèse aléatoire sur cellules végétales *in vitro* est potentiellement génératrice d'une grande diversité de phénotypes (voir 5.2), les produits de cette technique actuellement cultivés en France sont tous, à notre connaissance, des variétés de colza Clearfield. Le colza Clearfield représente l'ensemble des variétés de colza tolérantes à des herbicides cultivés en France aujourd'hui²². La tolérance concerne des herbicides inhibiteurs de l'acétolactate synthase (ALS). On pourrait donc s'interroger sur l'impact environnemental associé au caractère de tolérance à ces herbicides.

Or, ce caractère est également présent dans d'autres cultures, généré par d'autres techniques. Ainsi, l'ensemble des variétés de tournesol tolérantes à des herbicides cultivées en France présente également une tolérance à des inhibiteurs de l'ALS²³. Elles ont été générées soit par mutations spontanées, soit par mutagenèse *in vivo* sur graines (voir 5.2), techniques non concernées par le projet de décret.

L'impact environnemental associé aux mutants concernés par le projet de décret actuellement cultivés en France n'est donc pas spécifique de la technique décrite dans le décret, mais du caractère de tolérance à ces herbicides, qui peut être produit par différentes techniques.

Par ailleurs, au-delà de leur utilisation sur des variétés tolérantes, les herbicides inhibiteurs de l'ALS sont les herbicides les plus utilisés en France en termes de surfaces traitées, toutes cultures confondues, et cet usage répété a déjà conduit à la sélection d'adventices résistantes. L'impact de leur utilisation dépasse donc l'usage spécifique aux variétés tolérantes, qui dépasse l'usage associé à la technique de mutagenèse aléatoire de cellules végétales *in vitro*.

A contrario, il faut être attentif au fait que l'impact de la réglementation de cette technique est susceptible de concerner d'autres applications que l'obtention de variétés tolérantes à des herbicides. Autant de phénotypes dont il faudra examiner l'impact environnemental, au-delà de la technique d'obtention.

Au-delà de la question technique, la catégorisation d'un produit parmi les OGM relevant de l'ensemble des dispositions de la directive 2001/18/CE inclut la question de la traçabilité. Le CS n'a pas identifié de document de référence ayant abordé directement cette question pour la « mutagenèse aléatoire *in vitro* consistant à soumettre des cellules végétales cultivées *in vitro* ». Les travaux de l'ENGL (*European Network of GMO Laboratories*) (ENGL, 2019) ainsi que l'Avis du CS du HCB sur les NPBT (HCB, 2017) exposent les outils existants, et leurs limites, pour l'identification des variations génétiques à des fins de détection et de traçabilité. Le CS note qu'en l'absence de différences à l'échelle moléculaire, et dans le cadre actuel des moyens de contrôle reposant sur des techniques de biologie moléculaire, la traçabilité et l'attribution de mutations à une technique donnée d'obtention seraient très compliquées.

²² La culture de colza Clearfield couvrait environ 2 % des surfaces cultivées en colza en France en 2017, soit 30.000 ha [Anses (2019). Avis relatif à l'utilisation des variétés rendues tolérantes aux herbicides cultivées en France, pp. 256.].

²³ Les cultures de tournesol Clearfield, Clearfield plus et Express Sun couvraient environ 27 % des surfaces cultivées en tournesol en France en 2017, soit 160.000 ha (Anses (2019)).

7. Bibliographie

- Ahloowalia, B.S., Maluszynski, M., and Nichterlein, K. (2004). Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica* 135, 187-204.
- Albrecht, S., Mollers, C., and Robbelen, G. (1995). Selection *in vitro* for erucic-acid content in segregating populations of microspore-derived embryoids of *Brassica napus*. *Plant Breeding* 114, 210-214.
- Alissa, A.A., Jonard, R., Serieys, H., and Vincourt, P. (1986). La culture d'embryons isolés *in vitro* dans un programme d'amélioration du Tournesol. *Compte Rendu de l'Académie des sciences, série III* 302, 161-164.
- Anses (2019). Avis relatif à l'utilisation des variétés rendues tolérantes aux herbicides cultivées en France, pp. 256.
- Auerbach, C. (1949). Chemical mutagenesis. *Biological Reviews* 24, 355-391.
- Augé, R., Beauchesne, J., Boccon-Gibod, J., Decourtye, L., Digat, B., Jalouzot, R., Minier, R., Morand, J.-C., Reynoird, J.P., Strullu, D.G., *et al.* (1989). La culture *in vitro* et ses applications horticoles.
- Austin, S., Baer, M.A., and Helgeson, J.P. (1985). Transfer of resistance to potato leaf roll virus from *Solanum brevidens* into *Solanum tuberosum* by somatic fusion. *Plant Sci* 39, 75-81.
- Austin, S., Lojkowska, E., Ehlenfeldt, M.K., Kelman, A., and Helgeson, J.P. (1988). Fertile interspecific somatic hybrids of *Solanum* : a novel source of resistance to *Erwinia* soft rot. *Phytopathology* 78, 1216-1220.
- Bairu, M.W., Aremu, A.O., and Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63, 147-173.
- Barro, F., Fernandez-Escobar, J., De La Vega, M., and Martin, A. (2001). Doubled haploid lines of *Brassica carinata* with modified erucic acid content through mutagenesis by EMS treatment of isolated microspores. *Plant Breeding* 120, 262-264.
- Barro, F., Fernandez-Escobar, J., De la Vega, M., and Martin, A. (2002). Modification of glucosinolate and erucic acid contents in doubled haploid lines of *Brassica carinata* by UV treatment of isolated microspores. *Euphytica* 129, 1-6.
- Beaith, M.E., Fletcher, R.S., and Kott, L.S. (2005). Reduction of saturated fats by mutagenesis and heat selection in *Brassica napus* L. *Euphytica* 144, 1-9.
- Belfield, E.J., Gan, X., Mithani, A., Brown, C., Jiang, C., Franklin, K., Alvey, E., Wibowo, A., Jung, M., Bailey, K., *et al.* (2012). Genome-wide analysis of mutations in mutant lineages selected following fast-neutron irradiation mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research* 22, 1306-1315.
- Bergmann, L. (1959). A new technique for isolating and cloning cells of higher plants. *Nature* 184, 648-649.
- Beversdorf, W.D., and Kott, L.S. (1987). An *in vitro* mutagenesis/selection system for *Brassica napus*. *Iowa State Journal of Research* 61, 435-443.

Carlson, P.S., Smith, H.H., and Dearing, R.D. (1972). Parasexual interspecific plant hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 69, 2292-2294.

Cocking, E.C. (1960). A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature 187, 962-963.

Cui, H.R., Wu, Q.Y., and Zhu, B. (2017). Specific-locus amplified fragment sequencing reveals spontaneous single-nucleotide mutations in rice *OsMsh6* mutants. BioMed research international 2017.

Daurova, A., Daurov, D., Volkov, D., Karimov, A., Abai, Z., Raimbek, D., Zhapar, K., Zhambakin, K., and Shamekova, M. (2020). Mutagenic treatment of microspore-derived embryos of turnip rape (*Brassica rapa*) to increase oleic acid content. Plant Breeding.

ENGL (2019). Detection of food and feed plant products obtained by new mutagenesis techniques - Report by the European Network of GMO Laboratories, 26 March 2019 (JRC116289).

FAO/IAEA (2018). Manual on Mutation Breeding - Third edition, M.M. Spencer-Lopes, B.P. Forster, and L. Jankuloski, eds. (Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations), pp. 301.

Ferrie, A.M.R., Taylor, D.C., Mackenzie, S.L., Rakow, G., Raney, J.P., and Keller, W.A. (2008). Microspore mutagenesis of *Brassica* species for fatty acid modifications: a preliminary evaluation. Plant Breeding 127, 501-506.

Gager, C.S., and Blakeslee, A.F. (1927). Chromosome and gene mutations in *Datura* following exposure to radium rays. Proc Natl Acad Sci USA 13, 75-79.

Gaul, H. (1961). Use of induced mutants in seed-propagated species. In Proc Symposium on mutation and plant breeding Pub 891, NAS-NRC, ed. (Washington), pp. 206-251.

Gautheret, R.J. (1939). Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie de tissus de tubercules de carotte. C R Acad Agr 208, 118-120.

Haberlandt, G. (1902). Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber Akad Wiss Wien Math-Naturwiss 111, 69-92.

Hannig, E. (1904). Zur Physiologie pflanzlicher Embryonen. I. Über die Kultur von Cruciferen-embryonen ausserhalb des Embryosacks. Bot Ztg 62, 45-80.

Haughn, G.W., Smith, J., Mazur, B., and Somerville, C. (1988). Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides. Mol Gen Genet 211, 266-271.

HCB (2017). Avis du Comité scientifique du Haut Conseil des biotechnologies sur les nouvelles techniques d'obtention de plantes (*new plant breeding techniques* — NPBT) en réponse à la saisine du 22 février 2016, pp. 90.

Heinz, D.J., and Mee, G.W.P. (1971). Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. American Journal of Botany 58, 257-262.

Henry, I.M., Nagalakshmi, U., Lieberman, M.C., Ngo, K.J., Krasileva, K.V., Vasquez-Gross, H., Akhunova, A., Akhunov, E., Dubcovsky, J., Tai, T.H., et al. (2014). Efficient genome-wide detection and

cataloging of EMS-induced mutations using exome capture and next-generation sequencing. *Plant Cell* 26, 1382-1397.

Heslot, H. (1961). L'induction expérimentale de mutations chez les plantes cultivées. *C R Acad Agr* 47, 694-704.

Hsu, F.-M., Gohain, M., Allishe, A., Huang, Y.-J., Liao, J.-L., Kuang, L.-Y., and Chen, P.-Y. (2018). Dynamics of the methylome and transcriptome during the regeneration of rice. *Epigenomes* 2, 14.

Hu, M., Pu, H., Kong, L., Gao, J., Long, W., Chen, S., Zhang, J., and Qi, C. (2015). Molecular characterization and detection of a spontaneous mutation conferring imidazolinone resistance in rapeseed and its application in hybrid rapeseed production. *Mol Breed* 35.

Huang, W., Lyman, R.F., Lyman, R.A., Carbone, M.A., Harbison, S.T., Magwire, M.M., and Mackay, T.F.C. (2016). Spontaneous mutations and the origin and maintenance of quantitative genetic variation. *Elife* 5, 23.

Jander, G., Baerson, S.R., Hudak, J.A., Gonzalez, K.A., Gruys, K.J., and Last, R.L. (2003). Ethylmethanesulfonate saturation mutagenesis in *Arabidopsis* to determine frequency of herbicide resistance. *Plant Physiology* 131, 139-146.

Janska, A., Zelenkova, S., Klima, M., Vyvadilova, M., and Prasil, I.T. (2010). Freezing tolerance and proline content of *in vitro* selected hydroxyproline resistant winter oilseed rape. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 46, 35-40.

Kaeppeler, S.M., Kaeppeler, H.F., and Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43, 179-188.

Kharkongar, H.P., Khanna, V.K., Tyagi, W., Rai, M., and Ngasepam, T. (2013). Wide hybridization and embryo-rescue for crop improvement in *Solanum*. *Agrotechnology*.

Kim, J.-H. (2019). Chromatin remodeling and epigenetic regulation in plant DNA damage repair. *Int J Mol Sci* 20.

Krasovec, M., Sanchez-Brosseau, S., and Piganeau, G. (2019). First estimation of the spontaneous mutation rate in diatoms. *Genome Biology and Evolution* 11, 1829-1837.

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.

Lemay, M.-A., Torkamaneh, D., Rigai, G., Boyle, B., Stec, A.O., Stupar, R.M., and Belzile, F. (2019). Screening populations for copy number variation using genotyping-by-sequencing: a proof of concept using soybean fast neutron mutants. *BMC Genomics* 20.

Li, C., Zhang, R., Meng, X., Chen, S., Zong, Y., Lu, C., Qiu, J.-L., Chen, Y.-H., Li, J., and Gao, C. (2020). Targeted, random mutagenesis of plant genes with dual cytosine and adenine base editors. *Nature Biotechnology*.

Liu, S., Wang, H., Zhang, J., Fitt, B.D.L., Xu, Z., Evans, N., Liu, Y., Yang, W., and Guo, X. (2005). *In vitro* mutation and selection of doubled-haploid *Brassica napus* lines with improved resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Cell Rep* 24, 133-144.

- Lu, Y., Dai, S., Gu, A., Liu, M., Wang, Y., Luo, S., Zhao, Y., Wang, S., Xuan, S., Chen, X., *et al.* (2016). Microspore induced doubled haploids production from ethyl methanesulfonate (EMS) soaked flower buds is an efficient strategy for mutagenesis in Chinese cabbage. *Frontiers in Plant Science* 7.
- Lucht, J.M., Mauch-Mani, B., Steiner, H.Y., Metraux, J.P., Ryals, J., and Hohn, B. (2002). Pathogen stress increases somatic recombination frequency in *Arabidopsis*. *Nature Genetics* 30, 311-314.
- McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A., and Henikoff, S. (2000). Targeting Induced Local Lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiology* 123, 439-442.
- McClintchey, S.L., and Kott, L.S. (2008). Production of mutants with high cold tolerance in spring canola (*Brassica napus*). *Euphytica* 162, 51-67.
- Mellor, F.C., and Stace-Smith, R. (1977). Virus-free potatoes and meristem culture. In *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*, J. Treinert, and Y.P.S. Bajaj, eds. (Springer Verlag Berlin), pp. 616-635.
- Miguel, C., and Marum, L. (2011). An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *J Exp Bot* 62, 3713-3725.
- Möllers, C., Rücker, B., Stelling, D., and Schierholt, A. (2000). *In vitro* selection for oleic and linoleic acid content in segregating populations of microspore derived embryos of *Brassica napus*. *Euphytica* 112, 195-201.
- Mondeil, F. (1974). Irradiation de microspores en culture d'anthères – essai d'une nouvelle technique d'obtention de mutations immédiatement décelables et fixables (application à *Nicotiana tabacum*). *Ann Amélior Plantes* 24, 1-11.
- Morel, G., and Martin, C. (1952). Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 235, 1324-1325.
- Ossowski, S., Schneeberger, K., Lucas-Lledó, 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.
- Parrilla-Doblas, J.T., Roldan-Arjona, T., Ariza, R.R., and Cordoba-Canero, D. (2019). Active DNA demethylation in plants. *Int J Mol Sci* 20, 19.
- Pelletier, G., Primard, C., Vedel, F., Chetrit, P., Remy, R., Rousselle, and Renard, M. (1983). Intergeneric cytoplasmic hybridization in cruciferae by protoplast fusion. *Mol Gen Genet* 191, 244-250.
- Rahbari, R., Wuster, A., Lindsay, S.J., Hardwick, R.J., Alexandrov, L.B., Al Turki, S., Dominiczak, A., Morris, A., Porteous, D., Smith, B., *et al.* (2016). Timing, rates and spectra of human germline mutation. *Nature Genetics* 48, 126-133.
- Reinert, J. (1959). Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta* 53, 318-333.
- Ricroch, A., Boussard, J.-M., Dattée, Y., Gallais, A., Gate, P., Houdebine, L.-M., Kressmann, G., Laquière, B., Gracien, P., Le Buanec, B., *et al.* (2018). Rapport - Les biotechnologies vertes : un enjeu stratégique pour l'avenir de la filière semencière française / Report - Green biotechnologies: a strategic issue for the future of the French seed industry Report. In *Notes Académiques de*

l'Académie d'agriculture de France/ Academic Notes from the French Academy of Agriculture, N3AF-2018 (2), pp. 1-20.

San, L.H., and Dattée, Y. (1985). Variabilité des haploïdes doublés par androgenèse et gynogenèse “*in vitro*”. Bulletin de la Société Botanique de France Actualités Botaniques 132, 23-33.

Schultz, S.T., Lynch, M., and Willis, J.H. (1999). Spontaneous deleterious mutation in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA 96, 11393-11398.

Serrat, X., Esteban, R., Guibourt, N., Moysset, L., Nogues, S., and Lalanne, E. (2014). EMS mutagenesis in mature seed-derived rice calli as a new method for rapidly obtaining TILLING mutant populations. Plant Methods 10.

Shirasawa, K., Hirakawa, H., Nunome, T., Tabata, S., and Isobe, S. (2016). Genome-wide survey of artificial mutations induced by ethyl methanesulfonate and gamma rays in tomato. Plant Biotechnol J 14, 51-60.

Skoog, F., and Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp Soc Exp Biol 11, 118-130.

Smulders, M.J.M., and de Klerk, G.J. (2011). Epigenetics in plant tissue culture. Plant Growth Regulation 63, 137-146.

Stadler, L.J. (1928). Mutations in barley induced by X-rays and radium. Science 68, 186-187.

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.

Stroud, H., Ding, B., Simon, S.A., Feng, S., Bellizzi, M., Pellegrini, M., Wang, G.-L., Meyers, B.C., and Jacobsen, S.E. (2013). Plants regenerated from tissue culture contain stable epigenome changes in rice. Elife 2.

Swanson, E.B., Coumans, M.P., Brown, G.L., Patel, J.D., and Beversdorf, W.D. (1988). The characterization of herbicide tolerant plants in *Brassica napus* L. after *in vitro* selection of microspores and protoplasts Plant Cell Rep 7, 83-87.

Swanson, E.B., Herrgesell, M.J., Arnoldo, M., Sippell, D.W., and Wong, R.S.C. (1989). Microspore mutagenesis and selection: Canola plants with field tolerance to the imidazolinones. Theor Appl Genet 78, 525-530.

Szarejko, I., and Forster, B.P. (2007). Doubled haploidy and induced mutation. Euphytica 158, 359-370.

Takahashi, H., Fukuhara, T., Kitazawa, H., and Kormelink, R. (2019). Virus latency and the impact on plants. Front Microbiol 10.

Takebe, I., Labib, G., and Melchers, G. (1971). Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Naturwissenschaften 58, 318-320.

Tan, C., Zhang, X.-Q., Wang, Y., Wu, D., Bellgard, M.I., Xu, Y., Shu, X., Zhou, G., and Li, C. (2019). Characterization of genome-wide variations induced by gamma-ray radiation in barley using RNA-Seq. BMC Genomics 20.

- Tan, S., Evans, R.R., Dahmer, M.L., Singh, B.K., and Shaner, D.L. (2005). Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag Sci* 61, 246-257.
- Thorpe, T. (2012). History of plant tissue culture. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 877, 9-27.
- Torres, K.C. (1989). Tissue culture of strawberry (*Fragaria*). In *Tissue culture techniques for horticultural crops*, K.C. Torres, ed. (Springer), pp. 96-101.
- Viana, V.E., Pegoraro, C., Busanello, C., and de Oliveira, A.C. (2019). Mutagenesis in rice: The basis for breeding a new super plant. *Frontiers in Plant Science* 10.
- White, P.R. (1939). Potentially unlimited growth of excised plant callus in artificial nutrient. *American Journal of Botany* 26, 59-64.
- Yang, G., Luo, W., Zhang, J., Yan, X., Du, Y., Zhou, L., Li, W., Wang, H., Chen, Z., and Guo, T. (2019). Genome-wide comparisons of mutations induced by carbon-ion beam and gamma-rays irradiation in rice via resequencing multiple mutants. *Frontiers in Plant Science* 10.
- Zhang, F.I., and Takahata, Y. (1999). Microspore mutagenesis and *in vitro* selection for resistance to soft rot disease in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Breed Sci* 49, 161-166.

Annexe 1 : Saisine



Réf. : D20007589

Paris, le - 2 JUL. 2020

La ministre de la Transition écologique et solidaire,

Le ministre de l'Agriculture et de l'Alimentation,

La ministre de l'Enseignement supérieur,
de la Recherche et de l'Innovation,

à

Monsieur le Président du Haut Conseil des biotechnologies
244, boulevard Saint-Germain
75007 Paris

Objet : saisine du Haut Conseil des biotechnologies sur la modification de l'article D.531-2 du code de l'environnement en fixant par décret la liste limitative des techniques ou méthodes de mutagenèse traditionnellement utilisées pour diverses applications et dont la sécurité est avérée depuis longtemps.

Monsieur le Président,

Fin 2014, neuf associations ont adressé un courrier au Premier Ministre demandant, d'une part, l'abrogation de l'article D.531-2 du code de l'environnement en ce qu'il exempte les variétés tolérantes aux herbicides (VTH) de la réglementation sur les OGM, et d'autre part un moratoire sur ces VTH. En l'absence de réponse, le collectif a déposé un recours au Conseil d'État.

Dans le cadre de cette procédure, le Conseil d'État a adressé à la Cour de justice de l'Union européenne (CJUE) plusieurs questions préjudicielles. L'arrêt rendu par la CJUE le 25 juillet 2018 est notamment venu clarifier le champ couvert par la Directive 2001/18, en précisant que tout produit d'une modification génétique est un OGM et que seuls sont exemptés de la procédure d'évaluation « les produits de techniques traditionnellement utilisées pour diverses applications et dont la sécurité est avérée depuis longtemps ».

Dans sa décision rendue le 7 février 2020, le Conseil d'État vient appliquer la décision de la CJUE, et enjoint au Premier ministre, dans un délai de six mois, de modifier l'article D.531-2 du code de l'environnement en fixant par décret la liste limitative des techniques ou méthodes de mutagenèse traditionnellement utilisées pour diverses applications et dont la sécurité est avérée depuis longtemps.

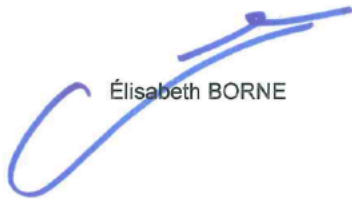
.../...

Hôtel de Roquelaure
246 boulevard Saint-Germain – 75007 Paris
Tél : 33(0)1 40 81 21 22
www.ecologie-solidaire.gouv.fr

Selon les dispositions du code de l'environnement, et notamment de son article L531-2, ce décret est pris après avis du Haut Conseil des biotechnologies.

Nous avons donc l'honneur de solliciter l'avis du HCB sur ce projet de décret, ainsi que sur deux projets d'arrêtés en lien avec ce texte.

Nous vous prions de croire, Monsieur le Président, à l'assurance de notre considération distinguée.



Élisabeth BORNE



Frédérique VIDAL



Didier GUILLAUME

Annexe 2 : Comité scientifique du HCB et élaboration de l'avis

Cet avis a été élaboré par le Comité scientifique (CS) du HCB à partir du travail préparatoire du groupe de travail d'experts (voir Annexe 3), examiné et adopté en séance du 29 juin 2020²⁴ en présentiel et en visioconférence, sous la présidence du Dr Jean-Christophe Pagès, la vice-présidence du Dr Pascal Boireau et du Dr Claudine Franche.

Le CS du HCB est un comité pluridisciplinaire composé de personnalités scientifiques nommées par décret au titre de leur spécialité en relation avec les missions du HCB. Par ordre alphabétique des noms de famille, le CS du HCB est composé de :

Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno Chauvel, Cécile Collonnier, Denis Couvet, Elie Dassa, Barbara Demeneix (démissionnaire)²⁵, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Jamal Khalife, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Valérie Le Corre, François Lefèvre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Eliane Meurs, Nadia Naffakh, Didier Nègre, Jean-Louis Noyer (démissionnaire)²⁶, Sergio Ochatt, Jean-Christophe Pagès, Xavier Raynaud, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Tristan Renault, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Hubert de Verneuil, Jean-Luc Vilotte²⁷.

Les membres du CS du HCB remplissent annuellement une déclaration publique d'intérêts. Ils sont également interrogés sur l'existence d'éventuels conflits d'intérêts avant l'examen de chaque dossier. Aucun membre du CS n'a déclaré avoir de conflits d'intérêts qui auraient pu interférer avec l'élaboration de cet avis.

²⁴ Membres du CS présents et représentés en présentiel ou en visioconférence lors de la discussion de ce texte en séance du 29 juin 2020 : Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Marie-Anne Barny, Pascal Boireau, Bruno Chauvel, Cécile Collonnier, Denis Couvet, Elie Dassa, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Valérie Le Corre, François Lefèvre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Eliane Meurs, Sergio Ochatt, Jean-Christophe Pagès, Xavier Raynaud, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Hubert de Verneuil, Jean-Luc Vilotte.

²⁵ Mention ajoutée le 15 juillet 2020 à 21h. Barbara Demeneix a démissionné le 3 décembre 2018. N'ayant pas été remplacée à ce jour, elle figure encore dans la composition du CS.

²⁶ Mention ajoutée le 15 juillet 2020 à 21h. Jean-Louis Noyer a démissionné le 7 novembre 2017. N'ayant pas été remplacé à ce jour, il figure encore dans la composition du CS.

²⁷ Composition du CS en vigueur suite au décret de nomination des membres du HCB du 30 décembre 2014, à la loi du 2 décembre 2015, et à l'arrêté du 10 avril 2017 portant nomination des membres du HCB.

Annexe 3 : Groupe de travail du CS et travail préparatoire à l'avis

Sur décision du bureau, le groupe de travail du Comité scientifique (CS) est composé de trois membres du CS, Claudine Franche, Philippe Guerche et Michel Renard, sélectionnés pour leurs compétences en biologie moléculaire et cellulaire végétale, génétique et amélioration des plantes. Les travaux du groupe de travail ont été suivis par Jean-Christophe Pagès, Président du Comité scientifique et Président par intérim du HCB, et coordonnés par Catherine Golstein, responsable scientifique et chargée des affaires européennes auprès du HCB.

Le groupe de travail a consulté les experts supplémentaires suivants au titre de leur expertise, pour compléter ses compétences dans les domaines en lien avec la saisine :

Carole Caranta, Directrice de recherche INRAE (Génétique et biologie végétale)

Mathilde Causse, Directrice de recherche INRAE (Génétique et amélioration des fruits et légumes)

Élisabeth Chevreau, Directrice de recherche INRAE (Biotechnologie des arbres fruitiers)

Yves Chupeau, Directeur de recherche honoraire INRAE (Biologie cellulaire végétale)

Jacques David, Professeur Montpellier Supagro-INRAE-CIRAD (Génétique et évolution des plantes cultivées)

André Gallais, Professeur honoraire AgroParisTech (Génétique et amélioration des plantes)

Emmanuel Guiderdoni, Chercheur CIRAD (Biologie cellulaire et moléculaire)

Laurence Hibrand Saint-Oyant, Ingénieure de Recherche INRAE hors classe (Biotechnologies et génétique de plantes ornementales)

Jean-Louis Noyer, Directeur Adjoint du Département Bios CIRAD (Espèces tropicales)

Georges Pelletier, Directeur de recherche honoraire INRAE (Génétique physiologique et biotechnologie végétale)

Jean-Christophe Pagès a également été sollicité par les membres du groupe de travail pour son expertise en génétique moléculaire.

Les experts externes ont apporté leur expertise en réponse aux sollicitations du groupe de travail mais n'ont pas participé à la rédaction du présent avis, qui est de la responsabilité du Comité scientifique du HCB.

Le groupe de travail s'est réuni en visioconférence les 10, 12, 16, 17, 18, 23, 26 et 28 juin 2020. Il a auditionné en visioconférence Jean-Louis Noyer le 17 juin, et Carole Caranta le 23 juin.

Des réunions mixtes avec le groupe de travail du CEES se sont tenues en visioconférence le 10 juin (lancement des travaux de la saisine) et le 18 juin (présentations des questions traitées, méthodologies de travail et échanges entre les membres des deux groupes de travail).

Le groupe de travail a présenté ses travaux (question posée et méthodologie suivie) en assemblée plénière du HCB le 24 juin et reçu les premières contributions des membres du HCB à cette occasion.

A la suite de l'assemblée plénière, le groupe de travail a finalisé son rapport, qui a été soumis en tant que projet d'avis du CS pour un examen en séance du CS le 29 juin 2020.

Annexe 4 : Techniques de culture *in vitro*

Les principales techniques de culture *in vitro* sont :

- **Micropropagation**

La micropropagation ou multiplication végétative *in vitro* ou consiste à prélever sur la plante un organe ou morceau d'organe (bourgeon, morceau de feuille ou de racine, ...) à le cultiver en conditions aseptiques sur des milieux choisis qui permettront soit le développement de bourgeons préexistants, soit la néoformation de bourgeons ou d'embryons somatiques qui pourront donner des plantes identiques à la plante mère.

- **Culture de méristèmes**

Les méristèmes sont formés de cellules indifférenciées ou peu différenciées, à activité mitotique importante, qui peuvent, en se multipliant, donner naissance à tous les tissus de la plante. Les méristèmes sont situés à l'apex des tiges et des rameaux, dans les bourgeons axillaires à l'aisselle des feuilles, dans les entre-nœuds et à l'apex des racines.

- **Embryogenèse somatique**

Cette technique désigne le développement d'un embryon à partir de cellules non germinales prélevées sur des explants issus de l'appareil végétatif de la plante ou à partir de cellules végétales somatiques cultivées *in vitro*. Des traitements par des régulateurs de croissance vont permettre la multiplication des cellules puis une différenciation progressive des embryons en culture.

- **Sauvetage d'embryons**

Le sauvetage d'embryons consiste à prélever un embryon quelques jours après la fécondation et à le cultiver *in vitro*, soit pour accélérer les cycles végétatifs, soit parce qu'il ne pourrait pas se développer dans les tissus maternels, par exemple lorsqu'il résulte d'un croisement interspécifique.

- **Protoplastes**

Les protoplastes sont des cellules végétales débarrassées de leur paroi pecto-cellulosique suite à des traitements enzymatiques. Si les protoplastes sont souvent isolés à partir de feuilles, ils peuvent aussi être obtenus à partir de cals, de suspensions cellulaires ou d'organes végétaux tels que les tiges, les racines ou les fleurs. Sous l'influence de traitements physiques ou chimiques, il est possible de faire pénétrer dans ces cellules des molécules diverses telles que des acides nucléiques, des organites comme des mitochondries et des chloroplastes, voire des noyaux.

- **Haplo-diploïdisation**

L'haplo-diploïdisation consiste à obtenir des individus haploïdes doublés à partir de cellules reproductrices mâle (androgenèse) ou femelle (gynogenèse). Ces cellules germinales contiennent une seule copie du génome (cellules haploïdes) au lieu des deux présentes dans les cellules somatiques (cellules diploïdes). Au cours du développement de la plante, on peut obtenir le doublement à l'identique du génome haploïde par application d'un composé chimique, la colchicine. Cette technique est aussi utilisée pour doubler le stock chromosomique des hybrides issus de croisements d'espèces non compatibles afin d'obtenir des graines. C'est le cas des Triticales, par exemple, qui sont des hybrides artificiels créés par croisement entre le blé et le seigle et dont le stock chromosomique est doublé par utilisation de la colchicine (Cauderon et Cauderon, 1993).

Cauderon Y., et Cauderon A. (1993). Le Triticale : première céréale créée par l'homme. *Natures-Sciences-Sociétés*, 1(2).

Annexe 5 : Analyse de la base de données de mutants FAO/AIEA

La base de données « Mutant Variety Database » issue d'un programme conjoint FAO/AIEA contient 3332 variétés végétales (<https://mvd.iaea.org/>, dernière consultation le 26 juin 2020). Étant alimentée sur une base volontaire, la base de données FAO/AIEA ne revendique pas l'exhaustivité.

Le premier objectif de cette analyse a été d'obtenir un jeu de données associé à l'application de mutagenèse aléatoire en conditions *in vitro* qui soit le plus complet possible. La recherche du mot-clef « *in vitro* » permet d'extraire 44 entrées. Les entrées n'étant toutefois pas décrites de manière homogène et systématique, le champ de recherche a été élargi avec des mots-clefs supplémentaires associés à la culture *in vitro*, tels que « callus », « somaclonal », « meristem » et « protoplast ». L'ensemble de ces recherches a permis d'élargir le jeu de données à 96 entrées uniques en recoupant les entrées extraites avec ces 5 mots-clefs.

Dans le contexte de la saisine et considérant le projet de décret et les projets d'arrêtés en lien avec le projet de décret, les variétés de colza Clearfield ont été recherchées et se sont avérées absentes de la base. De plus, aucune entrée n'a été identifiée avec le mot-clef « microspores » et seulement 4 avec « herbicide ». Il a été conclu que la base de données n'était pas pertinente pour effectuer des analyses statistiques sur les mutants *in vitro* couverts par le projet de décret.

Les données effectivement présentes dans la base ont toutefois été analysées à titre indicatif.

- Familles de plantes

Le jeu de données associé à la mutagenèse aléatoire *in vitro* contient 95 variétés végétales et un champignon.

Parmi les 95 variétés végétales, la grande majorité correspond à des plantes ornementales (« Decorative trees, Flowers, Grasses »), viennent ensuite les plantes de grande culture (« Cereals, Edible oil plants, Root and tuber crops »). Les plantes fruitières (« Berries ») et potagères (« Food vegetables ») ne représentent à elles seules que 7 entrées (Figure 1).

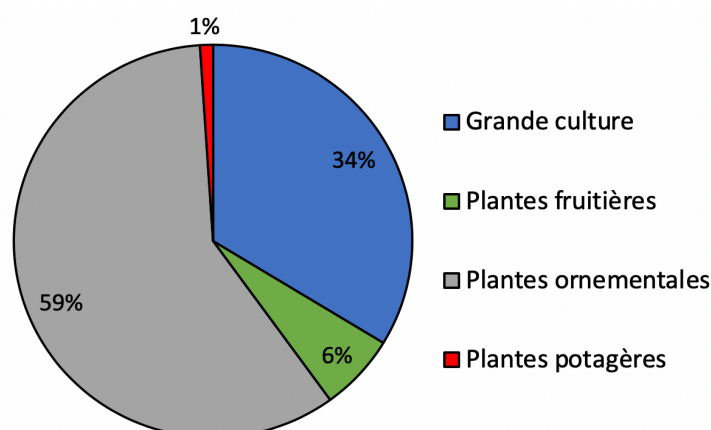


Figure 1. Répartition des mutants générés *in vitro* par familles de plantes

- Évolution du nombre de dépôts

Pour chaque entrée, une date de dépôt national (ou à défaut une date de dépôt régional) est disponible. Il est ainsi possible de mettre en évidence une dynamique croissante des dépôts de variétés végétales générées par mutagenèse *in vitro* dès la fin des années 1980, dans le contexte de la dynamique de dépôt de l'ensemble des variétés mutantes figurant dans la base de données FAO/AIEA.

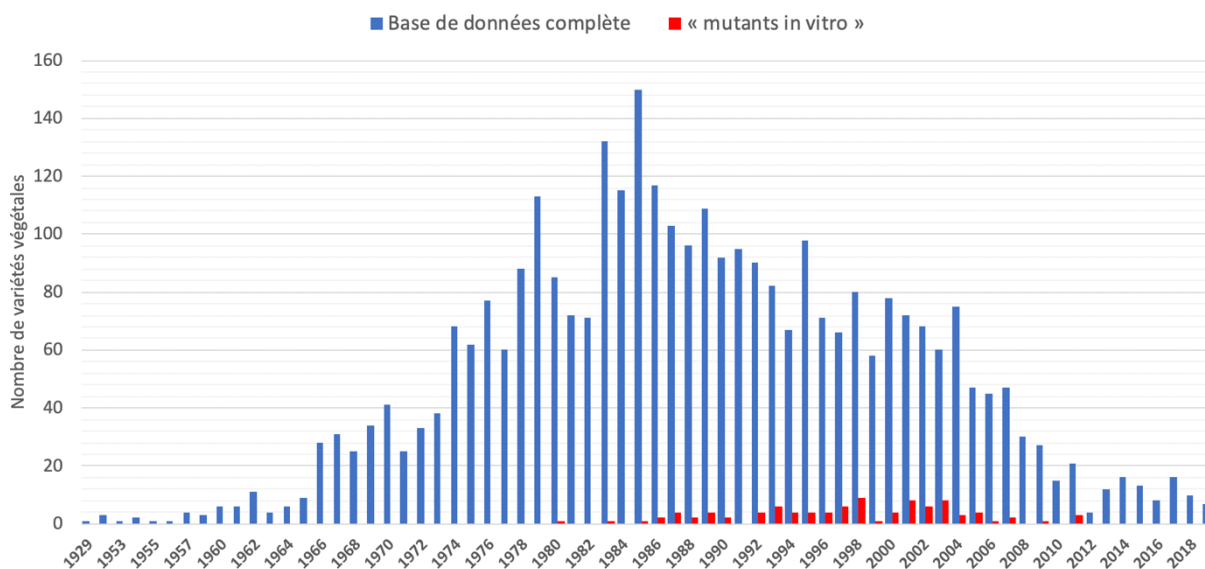


Figure 2. Évolution du nombre de dépôts de variétés mutantes dans la base de données FAO/AIEA au cours du temps

La proportion de chaque sous-famille de plantes des variétés générées *in vitro* déposées au cours du temps dans la base de données FAO/AIEA est représentée dans la Figure 3.

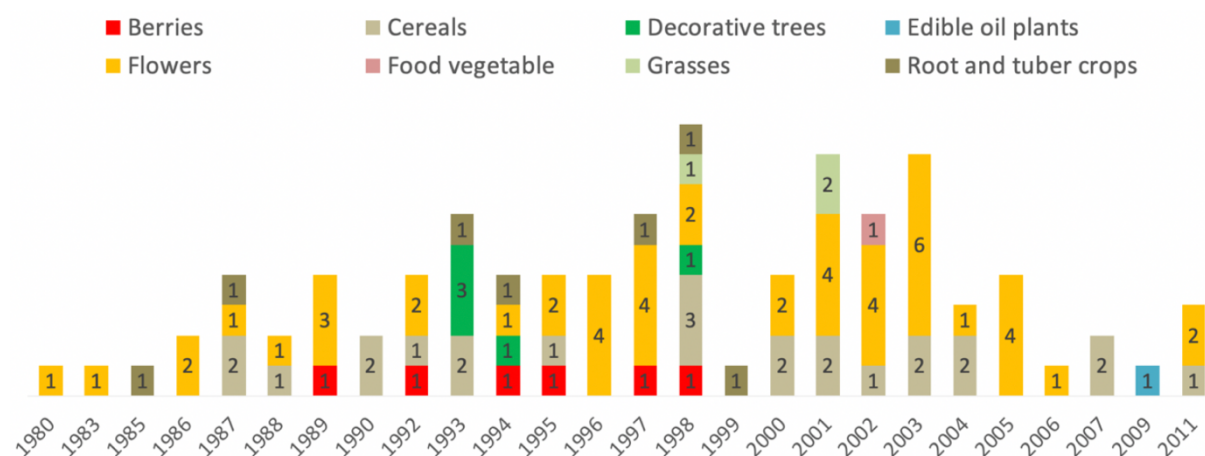


Figure 3. Histogramme empilé représentant l'évolution du nombre de variétés issues de mutagenèse *in vitro* déclarées dans la base de données FAO/AIEA par sous-famille de plantes au cours du temps

- Phénotypes

Les caractères phénotypiques sélectionnés sont variés (84 caractères uniques pour 95 variétés mutantes générées *in vitro*, Tableau 1).

Tableau 1. Caractères phénotypiques sélectionnés par familles de plantes

Caractère phénotypique	Sous-famille	Famille
Extremely short plant and altered flower color: pale yellow; brown, deep purple pink	Decorative trees	Plantes ornementales
Extremely short plant and flower color: pinkish white, brown reddish purple	Decorative trees	
Improved flower color, outer standard ground color: rainbow; outer wing color: deep reddish brown	Decorative trees	
Brown outer keel color and wide keel	Decorative trees	
Dwarfness and altered flower color: yellow and deep red	Decorative trees	
Resistance to Fusarium oxysporum and changed flower color to uncolored cherry-red	Flowers	
Improved agronomic and botanical characteristics	Flowers	
Very compact growth and long flowering period	Flowers	
Altered flower color (intense pink)	Flowers	
Smaller number of flowers per flower stalk	Flowers	
Vivid red flower color	Flowers	
Deep orange red surface of flower	Flowers	
Vivid red flower color, suspended flower and large flower	Flowers	
Altered flower color and petal shape	Flowers	
Bright red flower color	Flowers	
Erect flower petal and bright yellow petal color	Flowers	
Erect flower petal and more transparent petal	Flowers	
Deep orange red flower color	Flowers	
Deep purple pink flower color	Flowers	
White flower color	Flowers	
Shorter stem	Flowers	
Bicolor outside pink inside white flower color	Flowers	
Reddish purple stem color and petal color	Flowers	
Irregulate petal color: pale greenish yellow	Flowers	
Less anthocyanin in leaf stem	Flowers	
More ligulose flowers and deep flower color	Flowers	
Pale orange yellow petal color	Flowers	
Vivid red monotone flower color	Flowers	
Bright reddish purple sepal color	Flowers	
Bright purple sepal color and less number of floral stalks	Flowers	
Vivid yellowish green petal color	Flowers	
Pinkish white sepal color	Flowers	
Spot on the leaf and no luster on the leaf	Flowers	
More wax on the leaf surface and top of the petal V-shape	Flowers	
Improved petal color and shape	Flowers	
Improved flower color	Flowers	
Shorter plant and shorter inflorescence	Flowers	
Short plant and marginal stripe ion leaves	Flowers	
Complex with light pink and bright orange yellow	Flowers	
Complex with light yellow and pink	Flowers	
Altered flower color (light orange on adaxial, dark yellow orange on abaxial side)	Flowers	
Mild orange flower color	Flowers	

Bright yellow flower color	Flowers	Plantes de grande culture
Light pinkish white flower color	Flowers	
More long stems, higher weight of total long stems	Grasses	
Taller plants	Grasses	
Better spring vigour, earlier green color of leaf and no browning in winter	Grasses	
High yield, early maturity and scab resistance	Cereals	
High grain yield and improved plant structure	Cereals	
Good quality and high grain yield	Cereals	
High grain yield, good grain quality, short growth duration and photoperiod insensitivity, tolerance to lodging and environmental stresses, and resistance to pests and diseases	Cereals	
Short stem	Cereals	
Shorter stem	Cereals	
Hairless leaves	Cereals	
Short stem and lower 1000-kernel weight	Cereals	
High tolerance to lodging	Cereals	
Reduced amylose content	Cereals	
Shorter stem (10%), but slightly smaller grain	Cereals	
Short stem and late maturity	Cereals	
Low amylose content	Cereals	
High yield (17.3% higher), tolerance to salinity and tolerance to drought	Cereals	
High yield, resistance to bacterial diseases and wide adaptability	Cereals	
Early maturity, high yield, disease resistance and high protein content	Cereals	
Tolerance to salinity and good quality	Cereals	
Early maturity	Cereals	
Short culm	Cereals	
Low amylose content and good taste	Cereals	
Low amylose content, good eating quality and high tolerance to low temperatures	Cereals	
Tolerance to salinity	Cereals	
Resistant to <i>Stenotarostrongylus spinki</i>	Cereals	
Drought tolerance		
Cycle		
Salinity tolerance		
High oil content and large number of seeds per head	Edible oil plants	
White skin tubers in contrast to red skinned parent Desiree, the rest of the genotype is unchanged	Root and tuber crops	
High yield and good quality	Root and tuber crops	
Tuber tolerant to browning	Root and tuber crops	
Suitable for brewing	Root and tuber crops	
Longer stem, less anthocyanin at leaf stem, light color at root stem and stronger bitterness	Root and tuber crops	
Less pithy tissue	Root and tuber crops	
Thicker branch, round flower petal and larger leaf	Berries	Plantes fruitières
Earlier harvest type and high yield	Berries	
Resistance to black leaf spot disease (<i>Alternaria alternata</i>)	Berries	
Early maturity	Berries	
Bright red fruit skin and light red flesh color	Berries	
Resistance to phytophthora rot (<i>Phytophthora nicotinae</i>)	Berries	
Resistance to leaf diseases	Food vegetables	Plante potagère