



HAL
open science

Synthèse sur la détection des produits issus des nouvelles technologies génomiques (NGT) appliquées aux plantes. Paris, Paris, le 26 novembre 2021

. Comité Scientifique Du Haut Conseil Des Biotechnologies, Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno B. Chauvel, Denis Couvet, Elie Dassa, 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.. Synthèse sur la détection des produits issus des nouvelles technologies génomiques (NGT) appliquées aux plantes. Paris, Paris, le 26 novembre 2021. [0] Haut Conseil des Biotechnologies. 2021, 29 p. hal-03752888

HAL Id: hal-03752888

<https://hal.inrae.fr/hal-03752888v1>

Submitted on 17 Aug 2022

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 - ShareAlike 4.0 International License

COMITÉ SCIENTIFIQUE

**Synthèse sur la détection des produits issus des nouvelles technologies
génomiques (NGT) appliquées aux plantes**

Paris, le 26 novembre 2021

TABLE DES MATIÈRES

ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	4
1. Introduction	6
1.1. Terminologie	8
1.2. Contexte des utilisations à visée économique	9
1.3. Contexte réglementaire	11
2. Effets des techniques de mutagenèse ciblée sur les génomes végétaux	12
2.1. Modifications à la cible	12
2.2. Modifications hors cibles	13
3. Contexte de mise en œuvre des technologies de mutagenèse ciblée pour la création variétale végétale	15
4. Détection des produits édités	18
4.1. Principes de la détection des OGM « conventionnels »	18
4.2. Développement des méthodes de détection des produits ODM, SDN1 et SDN2	21
4.3. Validation des méthodes de détection des produits ODM, SDN1 et SDN2	22
4.4. Contrôle du marché pour les produits ODM, SDN1, SDN2	22
4.5. L'édition laisse-t-elle des traces reconnaissables ?	23
4.6. Pratiques de détection envisagées	25
5. Perspectives	26
Annexe I Comité scientifique du HCB et élaboration de la synthèse	28
Annexe II Groupe de travail du CS et liste des personnes consultées pour l'élaboration de la présente synthèse.....	29

ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

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

BVL : *Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* (Institut fédéral allemand de protection des consommateurs et de sécurité sanitaire alimentaire)

Cas : *CRISPR-associated protein* (protéine associée aux CRISPR)

CJUE : Cour de Justice de l'Union Européenne

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

CRISPRi/CRISPRa : *CRISPR interference / CRISPR activation* (interférence de CRISPR / activation de CRISPR)

CS : Comité scientifique du Haut Conseil des Biotechnologies

DGCCRF : Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes

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

ENGL : *European Network of GMO Laboratories* (Réseau Européen de laboratoires sur les OGM).

GABA : *Gamma-aminobutyric acid* (Acide gamma-aminobutyrique)

JRC : *Joint Research Centre* (Centre commun de recherche [de la Commission européenne])

LNA : *Locked Nucleic Acids* (acide nucléique bloqué)

LNR : Laboratoires nationaux de référence

MN : Méganucléases

nCATS : *nanopore Cas9 Targeted-Sequencing* (Séquençage ciblé par nanopore Cas9)

NGS : *Next Generation Sequencing* (Séquençage de nouvelle génération)

NGT : *New Genomic Techniques* (Nouvelles techniques génomiques). Terme désignant les NPBT/NBT apparues depuis 2001.

NPBT : *New Plant Breeding Techniques* (Nouvelles techniques de sélection végétale) – terme appliqué aux plantes uniquement (de même que le terme plus imprécis, NBT, pour *New Breeding Techniques*)

ODM : *Oligonucleotide-directed mutagenesis* (mutagénèse oligonucléotide dirigée)

OGM : Organisme génétiquement modifié

OMC : Organisation mondiale du commerce

PCR : *Polymerase chain reaction* (Réaction en chaîne par polymérase)

SNP : *Single Nucleotide Polymorphism* (polymorphisme d'un seul nucleotide)

UE : Union Européenne

UEAA : Union Européenne des Académies d'Agriculture

RdDM : *RNA-directed DNA methylation* (Méthylation de l'ADN dirigée par l'ARN)

RH : Recombinaison homologue

SDN : *Site Directed Nuclease* (nucléases site-spécifiques)

SNV : *Single nucleotid variants* (variant d'un seul nucleotide)

TALEN : *Transcription activator-like effector nucleases* (nucléases effectrices de type activateur de transcription)

TIGV : *Targeted induced genetic variation* (variation génétique ciblée induite)

VrTh : Variétés rendues tolérantes aux herbicides

WFSR : *Wageningen Food Safety Research* (Recherche sur la sécurité alimentaire de Wageningen)

ZFN : *Zing-finger nuclease* (Nucléase à doigt de zinc)

Synthèse sur la détection des produits issus des nouvelles technologies génomiques (NGT) appliquées aux plantes

1. Introduction

La question du statut réglementaire des NGT (*New Genomic Techniques*), qui ont été définies comme techniques de modification du génome « apparues » depuis 2001¹, est actuellement débattue en Europe. Ces techniques n'existaient pas, ou étaient peu développées lors de l'adoption des directives et règlements européens qui encadrent actuellement les organismes génétiquement modifiés (OGM). A l'époque le législateur européen avait choisi de réglementer les techniques de transgénèse et d'exempter les méthodes de mutagenèse notamment sur la base d'une expérience d'usage n'ayant révélé aucun problème particulier. Certaines NGT pouvant être utilisées pour induire une mutagenèse, ciblée ou non², la question de leur soumission à la réglementation européenne en vigueur fait l'objet de discussions juridiques et politiques depuis quelques années. Les données scientifiques relatives à ces technologies (définitions, méthodes et résultats) doivent permettre de guider ces discussions.

Jusqu'ici de nombreuses variétés végétales ont été produites par diverses méthodes de mutagenèse, y compris des variétés de semences tolérantes aux herbicides (VrTh). Du fait de l'exemption de la mutagenèse, elles ont été cultivées après avoir été inscrites au registre national et au catalogue commun européen sans être soumises à la réglementation OGM. La transposition française de la directive 2001/18/CE ne considérait pas ces variétés, en ne retenant pas leur statut d'OGM exemptés. La Confédération paysanne et huit autres associations ont ouvert un litige avec le Premier Ministre et le Ministre de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, et ont porté la question de l'encadrement réglementaire de ces VrTh devant le Conseil d'État en mars 2015. En octobre 2016, le Conseil d'État, avant de statuer, a demandé l'interprétation de la Cour de Justice de l'Union Européenne (CJUE) sur le statut de la mutagenèse, dans toutes ses formes, selon la directive 2001/18³.

Dans son arrêt rendu le 25 juillet 2018⁴, la CJUE confirme que les produits issus de techniques de mutagenèse antérieures à la directive (donc considérées comme ayant depuis longtemps fait la preuve de leur innocuité) peuvent être exemptés d'évaluation des risques, les techniques de mutagenèse dirigée apparues après 2001 y étant elles soumises⁵.

¹ La Commission Européenne a défini les « NGT » par rapport à la directive 2001/18. Les NGT sont donc caractérisées comme étant « apparues » depuis 2001. Notons cependant que les techniques qui y sont incluses étaient déjà utilisées avant 2001 : exemple des méganucléases et des ZFN dont les premières publications datent des années 1990, ou encore des ODM utilisées depuis les années 1970.

² Les systèmes ciblés peuvent dans des formes dérivées être utilisés pour des applications non ciblées.

³ CE, 3^{ème} et 8^{ème} chambres réunies, 3 octobre 2016, n°388649, Confédération paysanne et autres.

⁴ CJUE, Grande chambre, 25 juillet 2018, Affaire n° C-528/16, Confédération paysanne e.a. contre Premier ministre et ministre de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la forêt.

⁵ A la suite de ce retour le Conseil d'État a, le 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 après consultation du HCB. Le HCB a rendu son Avis le 7 juillet 2020. Un deuxième contentieux concernant la mise en œuvre de la décision du 7 février 2020 a conduit le conseil d'Etat à poser une nouvelle question préjudicielle à la CJUE le 08 novembre 2021 concernant la prise en compte, dans la définition du périmètre des OGM, de la variation somaclonale liée à la mise en œuvre de certaines techniques de mutagenèse aléatoire.

A la suite de cet arrêt, le Conseil de l'UE a rendu une décision (UE 2019/1904)⁶ demandant à la Commission de conduire une étude sur le statut des NGT dans le droit de l'Union, en proposant le cas échéant des mesures pour lever les ambiguïtés juridiques soulevées. Le 29 avril dernier, la Commission européenne rendait publique cette étude⁷, s'appuyant sur des avis scientifiques et techniques de l'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments), du JRC (*Joint Research Center*, laboratoire de recherche scientifique et technique de la Commission européenne), et des consultations des États membres et de 58 parties prenantes. Dans cette étude, la Commission estime que la législation actuelle sur les OGM n'est pas adaptée à certaines techniques de modification génomique et propose une évolution du cadre réglementaire pour les produits végétaux issus de ces techniques, accompagnée d'une adaptation des procédures d'évaluation des risques et d'autorisation ainsi que des mesures d'étiquetage et de traçabilité.

L'une des principales difficultés d'application aux NGT de la réglementation en vigueur concerne la détection spécifique des événements porteurs de mutations ciblées générées par ces techniques dès lors qu'il n'y a pas d'intégration stable d'ADN exogène, qui est lui détectable.

Le présent rapport fait un point sur les possibilités offertes par les techniques actuelles de détection et sur les perspectives d'utilisations potentielles de nouvelles approches.

⁶ Décision (UE) n°2019/1904 du Conseil du 8 novembre 2019 invitant la Commission à soumettre une étude à la lumière de l'arrêt de la Cour de justice dans l'affaire C-528/16 concernant le statut des nouvelles techniques génomiques dans le droit de l'Union, et une proposition, le cas échéant pour tenir compte des résultats de l'étude.

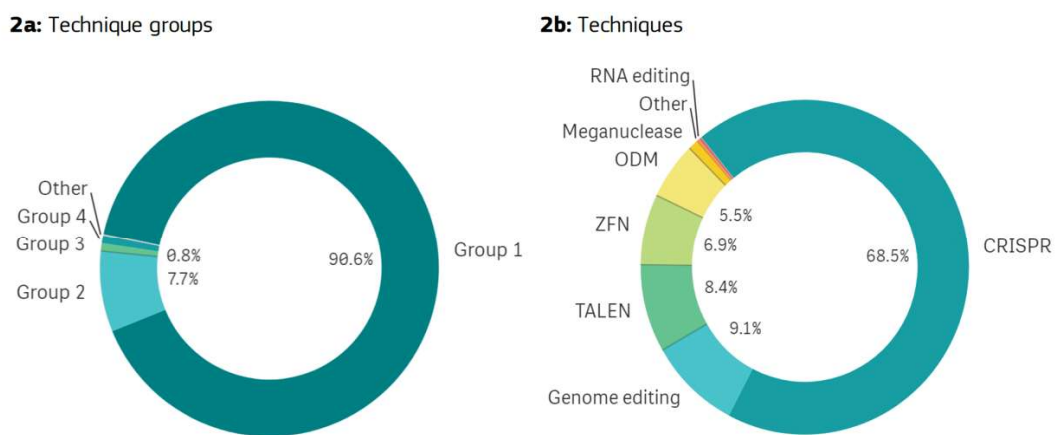
⁷ European Commission (2021) EC study on new genomic techniques Brussels, 29.4.2021 SWD (2021) 92 final, https://ec.europa.eu/food/plant/gmo/modern_biotech/new-genomic-techniques_en

1.1. Terminologie

Les NGT qui font l'objet du présent rapport peuvent être classées en 4 groupes⁸ :

- (1) Les techniques induisant une modification de la séquence du génome en créant une cassure du double brin d'ADN grâce à des nucléases dirigées (SDN : *site-directed nuclease*) : méganucléases (MN), *Zinc Finger nucléases* (ZFN), TALE Nucléases (*Transcription activator-like effector nucleases*), et les systèmes dérivés de CRISPR/Cas. Ces techniques peuvent conduire à des événements de mutagenèse, de cisgenèse, d'intragenèse et de transgenèse, tous ciblés dans un génome donné.
- (2) Les techniques induisant une modification de la séquence du génome par une cassure simple brin ou sans cassure induite de l'ADN, telles que la mutagenèse dirigée par oligonucléotide (ODM), les systèmes de « *base editing* » (Cas inactive fusionnée à une cytidine désaminase p.e.) et le « *prime editing* » (Cas inactive fusionnée à une transcriptase inverse).
- (3) Les techniques n'induisant pas de modification de la séquence du génome mais agissant sur l'expression des gènes, incluant les modifications épigénétiques telle que la méthylation d'ADN dirigée par l'ARN (RdDM), le principe d'interférence et l'utilisation de *site-directed effectors* (Cas inactive fusionnée à des inhibiteurs ou activateurs d'expression (CRISPRi/CRISPRa)).
- (4) Les techniques d'édition qui agissent directement sur l'ARN (« *RNA editing* »)⁹

Comme illustré en figure 1, les techniques du groupe 1 (SDN), notamment les techniques CRISPR, sont les plus exploitées dans le monde (91% des applications). Dans cet avis, seules les techniques de types 1 et 2 seront abordées¹⁰.



NB: 'Genome editing' refers to products for which no further specifics were provided.

Figure 1. Répartition des NGT utilisées sur plantes, champignons, animaux et cellules humaines à l'échelle mondiale, par groupe et selon la technique utilisée (Broothaerts et al., 2021).

⁸ Broothaerts, W., Jacchia, S., Angers, A., Petrillo, M., Querci, M., Savini, C., Van den Eede, G. and Emons, H., *New Genomic Techniques: State-of-the-Art Review*, EUR 30430 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2021, ISBN 978-92-76-24696-1, doi:10.2760/710056, JRC121847

⁹ Une description détaillée des techniques MN, ZFN, TALEN, CRISPR/Cas, cisgenèse/intragenèse/transgenèse, ODM, RdDM est donnée dans les fiches spécifiques du HCB disponibles en ligne : <http://www.hautconseildesbiotechnologies.fr/>

¹⁰ Toutefois, les techniques 3 et 4 posent également des questions probablement encore plus complexes de détection.

Les **SDN** peuvent être utilisées pour générer trois types de produits SDN1, SDN2 et SDN3, qui se caractérisent moins par la nucléase utilisée mais par la modification de l'ADN obtenue.

SDN1 désigne les produits portant des mutations aléatoires (insertion/délétion/substitution) d'une ou plusieurs paires de bases produites à la suite de la réparation d'une cassure double-brin ciblée de l'ADN, induite par une SDN. (Voir la fiche SDN sur le site du HCB).

SDN2 désigne les produits issus d'une cassure ciblée de l'ADN double-brin induite par une SDN réparée en présence d'une séquence d'ADN homologue à la cible portant une ou quelques modifications choisies. L'homologie de cette matrice permettrait un appariement à la cible et une « copie » se substituant à l'allèle initial (réparation par recombinaison homologue). On parle de remplacement d'allèle (ou conversion génique), l'allèle choisi conférant à l'organisme une caractéristique phénotypique connue et d'intérêt. Dans ce cas de figure, il n'y a pas, à strictement parler, d'insertion stable d'ADN double-brin (ADN recombinant) dans le génome. (Voir la fiche SDN sur le site du HCB).

Les produits finaux issus des techniques ODM, *base editing* et *prime editing* sont assimilables aux produits SDN1 et SDN2.

SDN3 : désigne les produits issus d'une cassure ciblée de l'ADN double-brin induite par une SDN et réparée en présence d'un fragment d'ADN exogène qui est « intégré¹¹ » dans le génome de manière stable. Ces produits peuvent être similaires à des OGM classiques à ceci près que l'insertion du transgène n'est pas faite aléatoirement dans le génome mais au site de la cible de la SDN. (Voir la fiche SDN sur le site du HCB).

La majorité des produits SDN3 est détectable par les méthodes utilisées pour la transgénèse conventionnelle, la présente étude se concentrera sur les possibilités de détection des produits SDN1 et SDN2 pris au sens large, *i.e.* issus des SDN, ODM, *base editing* et *prime editing*.

1.2. Contexte des utilisations à visée économique

Le débat actuel est d'autant plus important que la mise en application des NGT¹² est en plein essor, notamment en agronomie. Les techniques de mutagenèse ciblée utilisant le système CRISPR/Cas sont activement utilisées pour la modification de nombreuses espèces (plantes, champignons, animaux, micro-organismes, cellules humaines). Les applications aux stades de la commercialisation et de la pré-commercialisation sont encore réduites aujourd'hui mais la R&D (recherche et développement) est très riche¹³, ce que reflètent les nombreuses publications scientifiques afférentes.

¹¹ Le mécanisme de l'intégration de la séquence exogène fait appel à une recombinaison de séquences homologues (identiques) encadrant la séquence intégrée puis copiée dès la première division.

¹² HCB, Avis du Comité scientifique sur les Nouvelles techniques d'obtention de plantes (New plant breeding techniques – NPBT), 2017. Disponible sur le site internet du Haut Conseil des biotechnologies <http://www.hautconseildesbiotechnologies.fr/>

¹³ Parisi, C., Rodriguez-Cerezo, E., Current and future market applications of new genomic techniques, EUR 30589 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2021, ISBN 978-92-76-30206-3, doi:10.2760/02472, JRC123830.

Dans le secteur des végétaux, 3 produits¹⁴ issus de NGT sont actuellement sur le marché hors-Europe : une variété de soja à forte teneur en acide oléique obtenue aux États-Unis, une variété de tomate enrichie en acide gamma-aminobutyrique (GABA) au Japon, et enfin une variété de colza tolérante à certains herbicides au Canada.

Au stade de pré-commercialisation, c'est-à-dire commercialisables à l'horizon 2026 dans au moins un pays du monde, 16 applications sont déjà recensées d'après le JRC (*Joint Research Center*) (Figure 2). Il s'agit principalement d'espèces de grandes cultures (maïs, soja, riz et pomme de terre) qui présentent des caractères d'intérêt variés : tolérance à des herbicides, résistance à des champignons, composition modifiée en huile ou en amidon, propriétés anti-brunissement ; mais également de nouvelles applications comme des pois d'Angole et du lin tolérant à certains herbicides, ainsi que du cresson et de la caméline à teneur en huile modifiée.

Au stade de la R&D, 117 applications dans le domaine végétal sont en phase d'essais et pourraient être commercialisées d'ici à 2030. Il s'agit de plantes présentant des caractères de résistance à des maladies, de tolérance aux stress abiotiques (sécheresse, chaleur...), de tolérance à des herbicides, de modifications de composition (huile, amidon mais également teneurs en vitamines, fibres, toxines, allergènes, acrylamide et gluten) ou encore de meilleurs rendements, en termes de production ou de tailles de fruits et graines.

Enfin, 292 applications végétales des NGT sont à un stade précoce de R&D¹⁵.

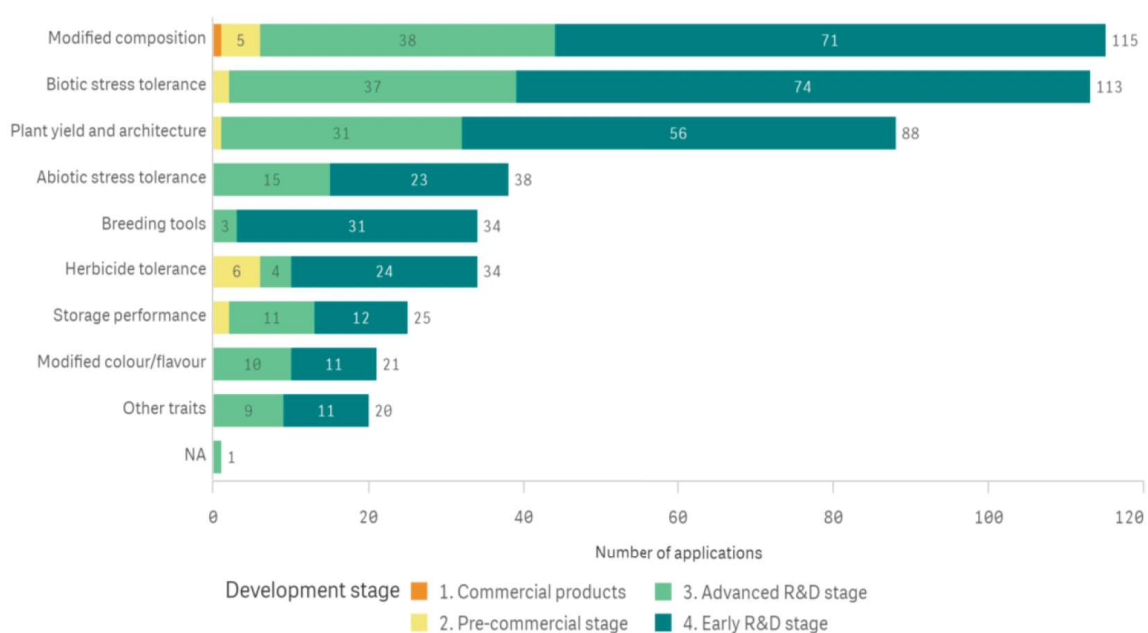


Figure 2. Classement des applications des NGT selon le type de caractère présenté et leur stade actuel de développement (*Parisi et Rodriguez-Cerezo, 2021*).

¹⁴ Notons qu'un animal édité par CRISPR, une dorade à masse musculaire augmentée, est en passe d'entrer sur le marché au Japon.

¹⁵ Parisi, C., Rodriguez-Cerezo, E., Current and future market applications of new genomic techniques, EUR 30589 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2021, ISBN 978-92-76-30206-3, doi:10.2760/02472, JRC123830. *Op. cit.* p.5.

1.3. Contexte réglementaire

Hors Union Européenne, de nombreux pays¹⁶ (Japon, Australie, Israël...) ont adapté leur législation pour les SDN : le plus souvent, si les modifications du génome ne sont pas associées à l'ajout d'ADN à la plante, alors le produit n'est pas soumis à la réglementation OGM¹⁷ ; les produits issus des techniques SDN1 et SDN2 ne sont pas évalués si les caractères introduits ne sont soumis à aucune autre réglementation particulière. En Norvège, le Conseil consultatif sur les Biotechnologies a proposé en décembre 2018 d'exempter les SDN1 et de mettre en œuvre une évaluation accélérée pour les événements SDN2. En Inde, un projet de « cadre réglementaire et lignes directrices pour l'évaluation des risques » a été publié. Ce document propose un classement selon le risque associé à l'édition, le groupe 1 correspondant à un faible risque (édition de quelques paires de bases), et le groupe 3 à un risque potentiellement plus élevé (large insertion ou ADN allospécifique). Actuellement, seules l'UE et la Nouvelle-Zélande (bien que des adaptations y soient à l'étude) réglementent systématiquement les produits issus de l'édition des génomes (Cf. Figure 3).

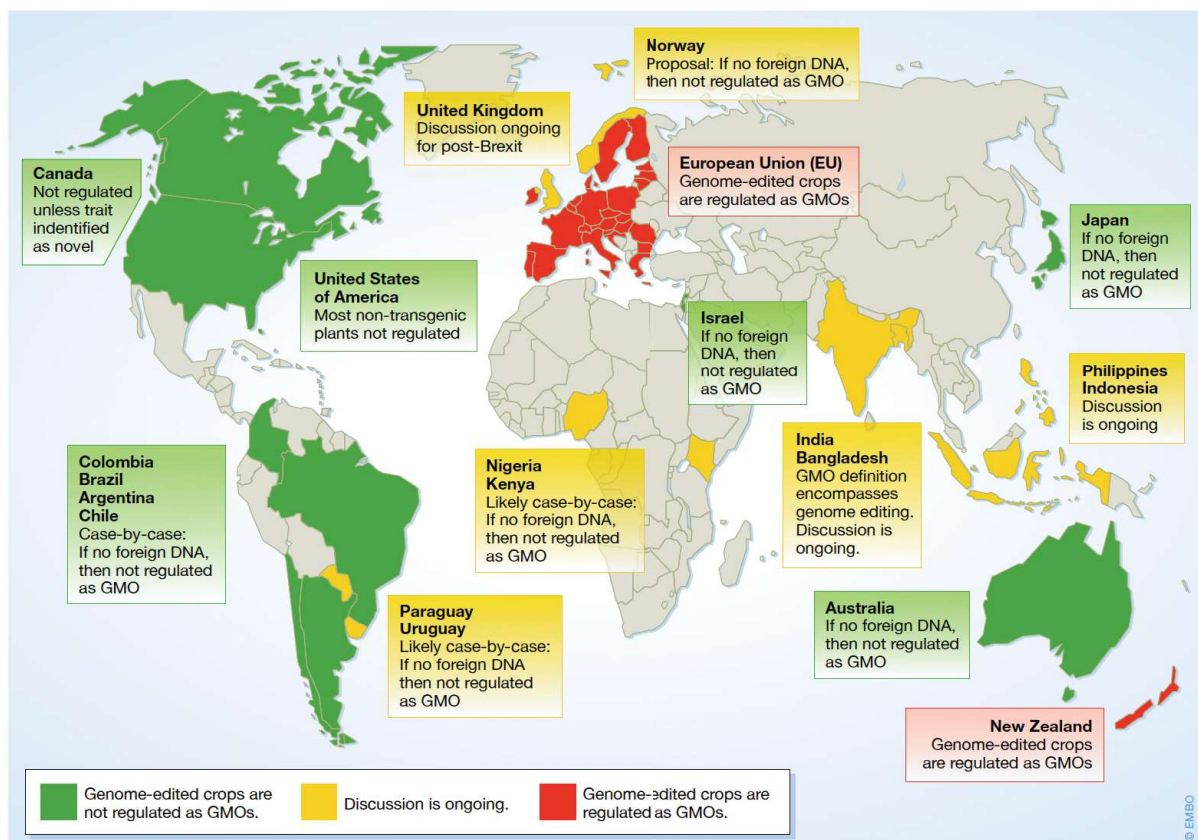


Figure 3. État actuel de la législation sur l'édition du génome à l'échelle mondiale (Schmidt et al., 2020)

¹⁶ Le Brésil impose un étiquetage sur les OGM depuis 2003 (décret n°4683), obligatoire à partir de 1% d'OGM par ingrédient, pour l'alimentation humaine et animale et produits issus d'animaux nourris aux OGM (symbole T pour transgénique dans un triangle jaune). La résolution normative 16/2018 dispense cependant de cette réglementation certains NBT (produits dont l'absence d'ADN/ARN recombinants est prouvée OU produits obtenus par une technique utilisant un ADN/ARN qui ne se multiplie pas dans une cellule vivante OU produits obtenus par une technique qui introduit des mutations dirigées vers un site produisant un gain ou perte de fonction génique mais dont l'absence d'ADN/ARN recombinant est prouvée, etc.).

¹⁷ Sarah M Schmidt, Melinda Belisle & Wolf B Frommer (2020) The evolving landscape around genome editing in agriculture, EMBO Reports (2020) 21: e50680

Étant donné la diversité des législations sur les produits issus de SDN1 et SDN2 selon les pays, leur appliquer une réglementation OGM dans l'UE nécessiterait de pouvoir tracer tout produit entrant sur le marché commun jusqu'à sa source d'origine.

Avant même d'évaluer l'impact qu'elle aurait sur les accords de l'OMC et sur les semenciers européens, cette option imposera de disposer de techniques de détection et d'identification spécifique permettant un traçage dépourvu d'ambiguïté. Ceci n'est pas actuellement le cas. De nombreux acteurs tant privés (Euroseeds) qu'académiques (Union Européenne des Académies d'Agriculture (UEAA)¹⁸) mentionnent la difficulté de mise en œuvre de méthodes qui ne sont actuellement pas définies.

2. Effets des techniques de mutagenèse ciblée sur les génomes végétaux

2.1. Modifications à la cible¹⁹

Comme pour un OGM, la détection et l'identification des variétés éditées par les SDN ou les ODM est fondée sur la mise en évidence des modifications génomiques de la cible. Ces modifications dépendent du type de système utilisé et des objectifs de sélection poursuivis.

Le système ODM permettrait la substitution d'une ou de quelques paires de bases (pb) à une (des) position(s) de la séquence cible au moment de la résolution du mésappariement de l'oligonucléotide utilisé²⁰.

Concernant les produits SDN1, la cassure double brin réparée par ligation (*end-joining*) induit principalement des délétions, insertions et/ou substitutions de quelques paires de bases. Des délétions de quelques dizaines à centaines de pb sont également possibles mais plus rarement²¹.

Si plusieurs SDNs sont utilisées en même temps pour induire des cassures simultanées en différents sites du génome (par multiplexage), des délétions de plus grandes tailles (plusieurs milliers de pb), ainsi que des réarrangements chromosomiques (translocations, inversions, etc.) peuvent se produire²², d'où l'utilisation séquentielle de ces techniques.

Dans l'approche SDN2, la cassure induite par la nucléase est réparée par recombinaison homologue (RH) en présence d'un ADN donneur identique à la cible sauf pour la partie de séquence déterminant l'allèle choisi. Il n'y a pas à proprement parler d'insertion d'ADN

¹⁸ Union of European Academies for Science Applied to Agriculture, Food and Nature. Gene editing and new EU regulations urgently needed, Novembre 2020.

¹⁹ Pour plus de limpidité de lecture les techniques sont décrites à la voie active. Toutefois les systèmes, bien qu'efficaces, nécessitent une ou plusieurs étapes de sélection. Voir plus bas.

²⁰ Sauer NJ, Narváez-Vásquez J, Mozoruk J, et al. Oligonucleotide-Mediated Genome Editing Provides Precision and Function to Engineered Nucleases and Antibiotics in Plants. *Plant Physiol.* 2016;170(4):1917-1928. doi:10.1104/pp.15.01696

²¹ Collonnier C, Epert A, Mara K, et al. CRISPR-Cas9-mediated efficient directed mutagenesis and RAD51-dependent and RAD51-independent gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biotechnol J.* 2017;15(1):122-131. Doi : 10.1111/pbi.12596

²² Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression [published correction appears in *Cell*. 2021 Feb 4;184(3):844]. *Cell.* 2013;152(5):1173-1183. doi:10.1016/j.cell.2013.02.022

recombinant. Les produits obtenus portent le nouvel allèle en lieu et place de l'allèle initial, sans modification de structure du gène²³.

En ce qui concerne les techniques de « *base editing* », elles induisent une mutation ponctuelle²⁴. Le produit obtenu s'apparente à un produit SDN1/2. De même, dans le « *prime editing* », la RT associée à la Cas désactivée utilise un ARN guide étendu comme matrice de réparation pour modifier la séquence cible²⁵, les produits sont aussi proches de SDN1/2.

Il est à noter que les mutations induites par ODM, SDN1 et SDN2, y compris par « *base editing* » et « *prime editing* », sont de même nature biochimique que les mutations spontanées ou celles obtenues par mutagénèse aléatoire²⁶.

2.2. Modifications hors cibles

L'édition du génome peut s'accompagner d'un nombre variable de coupures hors-cibles (« *off-target* ») parfois associées à des mutations. Les développements techniques récents concourent à les diminuer significativement, voire à ne plus en observer. Comme le CS du HCB l'a noté dans un précédent avis, la fréquence des « *off-target* » reste toutefois toujours beaucoup plus faible que celle observée par mutagénèse aléatoire²⁷.

Les paramètres déterminant la spécificité d'un ODM, tout comme ses mécanismes d'action, sont mal connus. La faible efficacité de cette technique s'associe à une faible probabilité d'incidence de modifications hors-cibles.

²³ EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (EFSA GMO Panel), Naegeli H, Bresson J, et al. Applicability of the EFSA Opinion on site-directed nucleases type 3 for the safety assessment of plants developed using site-directed nucleases type 1 and 2 and oligonucleotide-directed mutagenesis. *EFSA*. 2020;18(11). doi : 10.2903/j.efsa.2020.6299

²⁴ Komor, A., Kim, Y., Packer, M. *et al.* Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **533**, 420–424 (2016). <https://doi.org/10.1038/nature17946>

²⁵ Anzalone, A.V., Randolph, P.B., Davis, J.R. *et al.* Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* **576**, 149–157 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>

²⁶ Holme IB, Gregersen PL, Brinch-Pedersen H. Induced Genetic Variation in Crop Plants by Random or Targeted Mutagenesis: Convergence and Differences. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:1468. doi:10.3389/fpls.2019.01468

HCB, Avis du Comité scientifique sur les Nouvelles techniques d'obtention de plantes (New plant breeding techniques – NPBT), 2017. Disponible sur le site internet du Haut Conseil des biotechnologies <http://www.hautconseildesbiotechnologies.fr/>

²⁷ Avis CS HCB sur NBPT - 07/2020.

La spécificité des SDN dépend de divers facteurs et de nombreuses stratégies sont développées pour améliorer la spécificité²⁸. On peut citer par exemple :

- Pour les ZFN et TALEN :
 - L'utilisation de dimères de FokI et de nickases²⁹.
 - Le contrôle de l'exposition aux nucléases par des méthodes de transformation transitoires (« plasmides », réplicons viraux, ARNm, complexes protéiques).

- Pour les systèmes CRISPRs³⁰ :
 - La sélection par des programmes informatiques (CRISPOR³¹) des ARN guides n'ayant que très peu ou pas de séquences autres que celles de la cible dans le génome ce qui peut être vérifié sur les plantes obtenues par séquençage ciblé (BLESS³², GUIDE-seq³³, Digenome-seq³⁴ ou END-seq³⁵) ;
 - Le contrôle de la durée d'exposition à l'action du complexe CRISPR/Cas par des méthodes de transformation transitoires (« plasmides », réplicons viraux, ARNm, complexes ribonucléoprotéiques, Cas inductibles)³⁶ ;
 - La modification de l'architecture des ARN guides (troncature ou modification de structure)³⁷ ;
 - L'utilisation de protéines Cas plus « exigeantes » dans la sélection de l'appariement (variants produits par ingénierie, orthologues ...)
 - L'extension de la longueur de l'ADN ciblé par l'utilisation de couples de Cas nickases ou de Cas désactivées fusionnées à FokI³⁸.

Grâce à ces approches, la fréquence de coupures hors cible est faible, voire nulle³⁹. Dans le cadre de création variétale, la majorité, la quasi-totalité, des obtenteurs réalise un séquençage du génome des produits afin de suivre et « traiter » d'éventuelles mutations.

²⁸ Van de Wiel C.C.M., Schaart J.G., Lotz L.A.P., Smulders M.J.M. New traits in crops produced by genome editing techniques based on deletions. *Plant Biotechnol. Rep.* 2017;11: 1–8. doi: 10.1007/s11816-017-0425-z.

²⁹ Doyon Y, Vo TD, Mendel MC, Greenberg SG, Wang J, Xia DF, Miller JC, Urnov FD, Gregory PD, Holmes MC (2011) Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat Methods* 8:74–79

³⁰ I. Tasan and H. Zhao, Targeting Specificity of the CRISPR/Cas9 System. *ACS Synth. Biol.* 2017, 6, 9, 1609–1613. Publication Date : September 15, 2017 <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00270>

³¹ Haeussler, M., Schönig, K., Eckert, H. *et al.* Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol* **17**, 148 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1012-2>

³² Crosetto, N., Mitra, A., Silva, M. *et al.* Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. *Nat Methods* **10**, 361–365 (2013). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2408>

³³ Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, *et al.* GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol.* 2015;33(2):187-197. doi:10.1038/nbt.3117

³⁴ Kim D, Bae S, Park J, *et al.* Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods.* 2015;12(3):237-243. doi:10.1038/nmeth.3284

³⁵ Canela A, Sridharan S, Sciascia N, *et al.* DNA Breaks and End Resection Measured Genome-wide by End Sequencing. *Mol Cell.* 2016;63(5):898-911. doi:10.1016/j.molcel.2016.06.034

³⁶ Liang, Z., Chen, K., Li, T. *et al.* Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun* **8**, 14261 (2017). <https://doi.org/10.1038/ncomms14261>

³⁷ Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK (2014) Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol* **32**:279–284

³⁸ Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, Goodwin MJ, Aryee MJ, Joung JK (2014) Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotech* **32**:569–576

³⁹ Graham N, Patil GB, Bubeck DM, *et al.* Plant Genome Editing and the Relevance of Off-Target Changes. *Plant Physiol.* 2020;183(4):1453-1471. doi:10.1104/pp.19.01194

Jin S, Lin Q, Luo Y, *et al.* Genome-wide specificity of prime editors in plants. *Nat Biotechnol.* 2021;39(10):1292-1299. doi:10.1038/s41587-021-00891-x

Une variation « somaclonale » peut être observée lors des étapes de culture *in vitro*⁴⁰. Ces mutations sont donc également générées lors de l'utilisation d'autres techniques non soumises à évaluation des risques⁴¹ (sauvetage d'embryons, micropropagation, etc.)⁴². Si elles sont associées à un phénotype, ces mutations sont généralement détectées, ce qui permet leur élimination précoce. Pour de nombreuses espèces cultivées, celles qui persisteraient peuvent être diluées au cours des différentes étapes des schémas de sélection variétale appliqués.

Pour les marques épigénétiques potentiellement apposées sur le génome pendant les différentes étapes des protocoles d'édition, celles-ci sont réversibles. Elles sont modifiées de façon permanente, notamment en réponse à l'environnement, et à chaque génération.

Les processus d'obtention variétale nécessitent plusieurs étapes au cours desquelles les plantes sont sélectionnées. Dans la majorité des cas, plusieurs générations séparent l'étape d'édition du génome et la variété commercialisée. Les mutations hors cible peuvent être éliminées par croisements si un phénotype leur est associé. Chez les espèces à multiplication végétative et à cycles longs (ex : espèces ligneuses), les rétrocroisements sont néanmoins en pratique plus limités ou absents.

Les mutations hors cibles s'intègrent à la variabilité naturelle des plantes. Il est ici important de rappeler que des mutations spontanées, et aléatoires, se produisent chez tous les organismes vivants. C'est ce qui produit de la diversité génétique et permet la sélection de nouvelles variétés.

3. Contexte de mise en œuvre des technologies de mutagenèse ciblée pour la création variétale végétale

Le secteur de la création variétale a investi l'édition des génomes, d'une part pour acquérir de l'information sur les bases génétiques des caractères agronomiques d'intérêt, d'autre part pour la création de matériel commercialisable selon l'intérêt en sélection, y compris en termes économiques et si l'environnement réglementaire et social permet de l'envisager.

L'édition des génomes facilite l'utilisation de la diversité naturelle en accélérant les étapes d'identification et de validation des allèles d'intérêt. Certaines approches permettent de générer une diversité « nouvelle⁴³ » par l'induction de mutations ciblées dans des gènes d'intérêt connus, pour la création de nouveaux allèles (*Targeted induced genetic variation* (TIGV))⁴⁴.

⁴⁰ Modrzejewski D, Hartung F, Lehnert H, et al. Which Factors Affect the Occurrence of Off-Target Effects Caused by the Use of CRISPR/Cas: A Systematic Review in Plants. *Front Plant Sci.* 2020;11:574959. Published 2020 Nov 23. doi:10.3389/fpls.2020.574959

⁴¹ La décision du Conseil d'État met la France à une position unique en Europe.

⁴² A noter que pour le sauvetage d'embryons, la micropropagation, etc. si l'on ne passe pas par une phase de cal et donc de tissu non différencié, il y a moins d'instabilité génétique et donc de variations somaclonales.

⁴³ Nouvelle : elle peut l'être ou apparaître nouvelle si les collections ne reflètent pas la diversité naturelle existante.

⁴⁴ Nogué F, Mara K, Collonnier C, Casacuberta JM. Genome engineering and plant breeding: impact on trait discovery and development. *Plant Cell Rep.* 2016;35(7):1475-1486. doi:10.1007/s00299-016-1993-z

La plupart des sélectionneurs définissent leurs objectifs en considérant la variété comme l'association de deux composantes :

- Le fonds génétique⁴⁵ est le résultat d'un historique de sélection d'un ensemble de caractères complexes dont certains ont une héritabilité faible (quantitatifs, influencés par l'environnement). Il est sélectionné parmi l'ensemble des fonds génétiques disponibles (ou pool génétique) ;
- Les caractères (traits) : qui regroupent des caractères à héritabilité forte, dépendant d'1 à 3 loci maximum⁴⁶, parfaitement décrits, et sur lesquels portera la sélection ciblée.

En fonction des espèces, les caractères à éditer sont travaillés soit sur des variétés spécifiquement adaptées à la transformation puis introduits par rétrocroisement dans le châssis sélectionné, soit directement sur des variétés élites ce qui permet un gain de temps significatif dans les schémas de création variétale. A titre d'exemple, chez le maïs, les 2 approches sont envisageables et actuellement explorées par les sélectionneurs. Pour le tournesol, plus difficile à transformer, la tendance est encore à l'édition de variétés adaptées à la transformation suivie de rétrocroisements. Pour la tomate, l'édition de lignées parentales élites est à l'étude (avec notamment la mise au point de techniques de multiplexage) mais ne sera probablement réellement exploitée que dans quelques années en raison de la diversité des pools génétiques au sein desquels les caractères édités devraient être déployés. Pour l'instant, la conversion génique (introduction du gène édité dans le fonds choisi) par croisements et sélection assistée par marqueurs des populations resterait plus rentable selon les obtenteurs et les espèces, les obtenteurs mènent néanmoins des recherches sur l'édition.

A titre d'exemple, dans le cas d'espèces à reproduction sexuée pour lesquelles sont commercialisées des variétés de type hybride, que ce soit du matériel élite directement édité, ou des lignées éditées sélectionnées après rétrocroisements, celles-ci devront ensuite intégrer des cycles d'autofécondations puis de croisements destinés à les multiplier en quantité suffisante pour pouvoir les évaluer et éventuellement les utiliser pour la création de nouveaux hybrides.

Les nouvelles variétés générées doivent ensuite suivre un processus de production de semences commerciales pour l'inscription et l'autorisation de mise en marché. Enfin, les variétés inscrites doivent être multipliées chaque année pour répondre aux besoins des utilisateurs.

On peut donc estimer, chez les espèces cultivées et à multiplication par graines, qu'entre l'édition initiale et la première commercialisation une variété éditée aura subi entre 5 à 20 autofécondations (selon qu'elle aura été éditée en tant que lignée élite, lignée donneuse croisée avec une lignée élite, ou lignée intégrée dans une population de sélection initiale) et un certain nombre de croisements et de rétrocroisements réalisés pour la conversion génique et la production éventuelle d'hybrides (4 à 6 en moyenne). Un exemple de schéma de sélection d'une variété de tournesol éditée (cas d'un type variétal hybride F1 issue du croisement d'une lignée male stérile (CMS) et d'un restaurateur de fertilité) est présenté figure 4.

⁴⁵ Les obtenteurs utilisent fréquemment le terme de châssis.

⁴⁶ Pour des raisons pratiques, ce qui pourrait évoluer avec les techniques ciblées.

Les semenciers travaillent en parallèle sur les traits et le fonds génétique. Pour ce dernier, de nouvelles variétés bien adaptées à l'environnement sont développées de manière classique : croisement initial de lignées choisies pour créer une population hybride F1 qui subit ensuite des autofécondations successives avec une sélection assistée par marqueurs pendant les premières générations. Les individus sont évalués sur des critères de rendement, de teneur en huile et des facteurs de stabilité du rendement (résistance à certaines maladies et à la sécheresse, maturité adaptée...). Leur aptitude à la recombinaison est évaluée par croisement à l'aide de testeurs. Côté traits, de nouveaux caractères sont sélectionnés en parallèle dans des lignées donneuses de manière à pouvoir être transférés dans les lignées élite par croisement. Les caractères d'intérêt pour le tournesol peuvent être des tolérances à des herbicides (pour le contrôle de l'ambrosie par exemple), des teneurs en acide gras spécifiques et des tolérances aux maladies et parasites (orobanche, mildiou...). Plusieurs générations et rétrocroisements assistés par marqueurs sont nécessaires pour récupérer le fonds génétique du châssis. Le matériel doit ensuite être multiplié pour évaluer les performances agronomiques et tester l'aptitude à la recombinaison avec un testeur, avant le dépôt final pour inscription au catalogue.

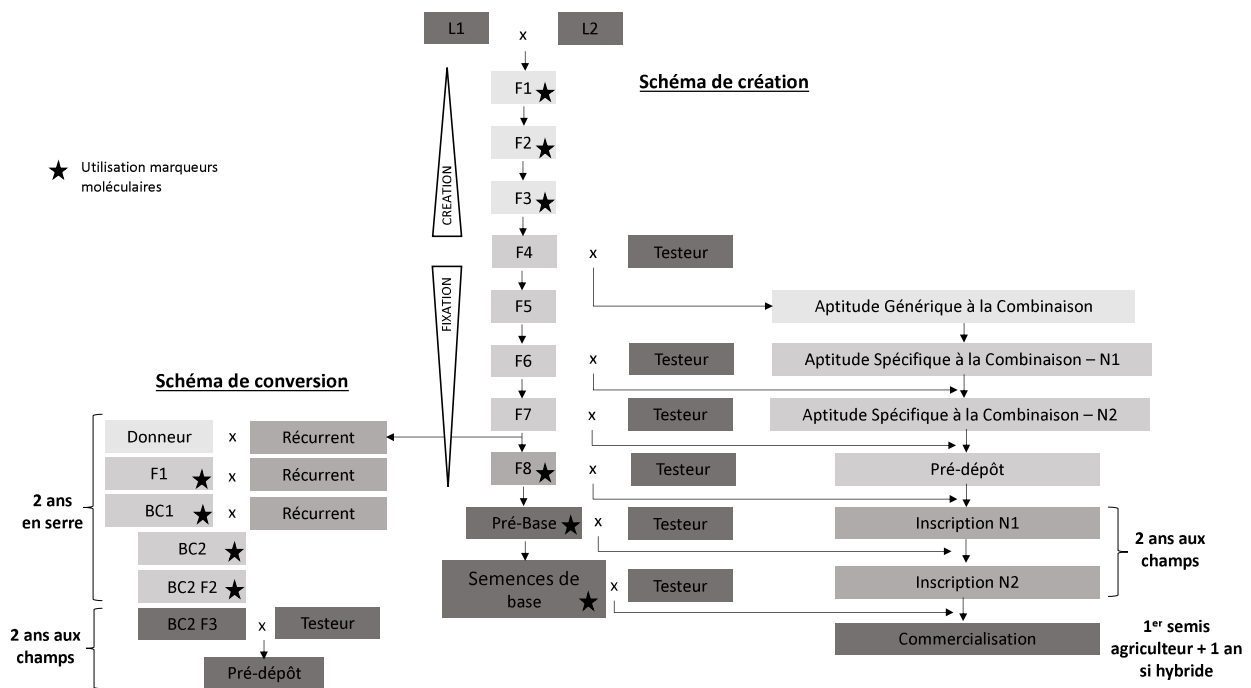


Figure 4 : Schéma de sélection d'une variété de tournesol éditée (cas d'un hybride F1 issu du croisement d'une lignée male stérile et d'un restaurateur de fertilité)

D'autre part, une lignée donneuse (« donneur » dans la figure 4) est généralement produite à 2 ou 3 générations de croisement avec l'individu chez lequel l'allèle d'intérêt a été édité. En effet, les donneurs sont la plupart du temps des lignées dans lesquelles ont été cumulés des traits qu'il est ainsi possible d'introgresser ensemble. Un donneur est donc souvent lui-même issu de plusieurs donneurs de génomes différents.

Un tel schéma de création variétale est extrapolable à de nombreuses espèces cultivées à reproduction sexuée. Dans le cas des espèces à multiplication végétative (fruitiers, vigne,

pomme de terre, ...), pour lesquelles la durée de vie des variétés est souvent beaucoup plus longue, le sélectionneur pourra chercher à éditer directement une variété commerciale. Le fonds génétique de ces variétés étant fortement hétérozygote, les rétrocroisements ne peuvent être appliqués pour une simple conversion génétique de celles-ci.

Chez la pomme de terre, par exemple, des variétés de bonne valeur agronomique peuvent être directement éditées puis multipliées (*in vitro* ou en serre) en quelques générations de clonage pour être caractérisées sur le terrain. Ces variétés maintenues par sélection conservatrice (multiplication végétative par les tubercules) sont commercialisées chaque année. Des variants peuvent apparaître mais ces mutations, si elles se traduisent par des modifications phénotypiques facilement observables (précocité, couleur de peau, etc.) peuvent être rapidement éliminées, grâce notamment aux observations réalisées annuellement dans les champs de comportement où les sélectionneurs peuvent décider du retrait de certains lots. Récemment, des variétés adaptées à la multiplication par graines ont été développées (TPS, *True Potato Seeds*) mais ce mode de propagation se heurte à certaines difficultés (incompatibilité pollinique, stérilité mâle, ...) et reste encore minoritaire.

4. Détection des produits édités

La question de la détection doit se comprendre selon les objectifs recherchés. Dans le contexte où les NGT seraient réglementées, elle doit non seulement permettre l'identification précise d'une modification génétique donnée, mais également permettre une distinction non contestable de la technique mise en œuvre pour la produire, sachant que plusieurs techniques peuvent donner des produits identiques et qu'une même mutation peut avoir été générée par sélection conventionnelle, par mutagenèse aléatoire -toutes deux non réglementées- ou par mutagenèse ciblée.

Les difficultés de détection trouveraient un prolongement dans la question de l'étiquetage. Si la transparence se doit d'être la plus complète possible, les informations données aux consommateurs doivent être fiables et imposent donc de disposer de moyens non contestables d'identification des techniques utilisées.

4.1. Principes de la détection des OGM « conventionnels »

Pour rappel de la situation actuelle, selon le contexte et les objectifs poursuivis (déclaration de conformité, contrôle à l'aveugle, étiquetage, règlement de litige...), les méthodes de détection utilisées actuellement peuvent être soit phénotypiques, i.e. liées à l'expression du génome, (ex : tests de tolérance à un herbicide, tests immunologiques de types ELISA ou strip tests, analyses métabolomiques...) soit génotypiques (PCR qualitative/quantitative, puces à ADN, séquençage ciblé ou de type NGS). Les procédures analytiques utilisées peuvent impliquer des tests de spécificité croissante permettant l'identification des éléments constitutifs de la construction insérée dans le génome, des construits utilisés ou des événements eux-mêmes.

Les méthodes de détection phénotypiques fournissent des preuves indirectes de la présence d'un OGM sans pouvoir, dans la majorité des cas, garantir une identification spécifique des événements potentiellement présents. Au contraire, les méthodes moléculaires permettent d'affirmer par une preuve directe qu'un élément génétique donné, une construction

transgénique particulière, ou un évènement de transformation précis sont présents dans l'échantillon. L'identification spécifique des évènements de transformation ou de modification génétique étant à la base de la réglementation européenne, le présent rapport se concentre donc plus particulièrement sur les méthodes moléculaires⁴⁷.

Avant toute autorisation de commercialisation d'un produit soumis à la réglementation OGM au sein de l'UE, le demandeur doit fournir une méthode de détection spécifique de l'évènement de transgénèse concerné. Les produits OGM autorisés sont étiquetés au seuil réglementaire de 0,9% par type d'ingrédient présent dans les échantillons testés⁴⁸, la méthode doit également permettre une quantification précise et fiable de la teneur en cet évènement par rapport à celle de l'espèce concernée pour laquelle il faut donc également disposer d'une méthode de quantification spécifique. La fourniture d'échantillons de référence utilisables comme contrôles positifs est également nécessaire. Les matériaux de référence certifiés (CRM) sont produits par le JRC à partir de ces échantillons et mis à disposition sur un catalogue en ligne⁴⁹.

La méthode fournie par le demandeur pour la détection spécifique de son évènement de transformation doit faire l'objet d'une validation par le laboratoire de référence de l'UE pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés (EURL GMFF)⁵⁰, assisté du réseau ENGL (*European Network of GMO Laboratories*), selon un certain nombre de critères de performance⁵¹. Les méthodes d'identification validées sont répertoriées par le JRC dans une base de données également accessible en ligne⁵². La grande majorité d'entre elles est jusqu'ici fondée sur l'amplification par PCR quantitative en temps réel des fragments de jonction de la cassette avec le génome (le site d'intégration aléatoire et unique de la cassette étant considéré comme signature de l'évènement de transformation). La technologie TaqMan® est fréquemment utilisée.

Pour augmenter la spécificité des méthodes de détection par PCR, ainsi que l'efficacité d'amplification (lorsque la cible se trouve dans une zone de séquences répétées, riche en AT, ou favorable à la dimérisation des amorces par exemple), différentes stratégies sont envisageables. La plus courante est l'utilisation de LNA (*Locked Nucleic Acids*, nucléotides dans lesquels le cycle ribose est verrouillé dans une conformation favorisant la liaison à l'ADN). Incorporés dans les amorces PCR, ils ont une forte affinité pour la cible qui augmente la spécificité et la sensibilité du test. D'autres techniques peuvent être envisagées comme la

⁴⁷ Un expert pense qu'une détection probabiliste serait envisageable. Néanmoins, les membres du CS soulignent qu'aucune valeur de cette probabilité ne pourrait être établie. Ainsi, le CS rappelle que la mention d'une probabilité ne serait pas une information fiable pour l'application de la réglementation, ni compréhensible par les consommateurs.

⁴⁸ Règlement (CE) 1830/2003 du Parlement Européen et du Conseil du 22 Septembre 2003 concernant la traçabilité et l'étiquetage des organismes génétiquement modifiés et la traçabilité des produits destinés à l'alimentation humaine ou animale produits à partir d'organismes génétiquement modifiés, et modifiant la directive 2001/19/CE. Journal officiel de l'Union européenne L268/24, 18.10.2003.

⁴⁹ Joint Research Center, European Commission. The Certified Reference Materials catalogue of the JRC. Consultable à l'adresse <https://crm.jrc.ec.europa.eu/?ref=1>.

⁵⁰ Règlement (CE) No 1829/2003 du Parlement Européen et du Conseil du 22 Septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et aliments pour animaux génétiquement modifiés. Off. J. Eur. Union L268, 18.10.2003.

⁵¹ European Network of GMO Laboratories (2015) Definition of minimum performance requirements for methods of GMO testing (http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/MPR%20Report%20Application%2020_10_2015.pdf).

⁵² European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EURL GMFF). GMOMETHODS. Consultable en ligne : <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>

*RNaseH2-dependent real-time PCR*⁵³ (où la RNase H2 active les amorces après leur hybridation améliorant la spécificité), ou la *digital droplet PCR (ddPCR)*⁵⁴ (les effets des inhibiteurs de PCR et à la compétition entre la cible et le fonds génétique y sont drastiquement réduits).

Lors des contrôles, les laboratoires nationaux de référence (LNR) en charge de la mise en œuvre de la réglementation OGM appliquent une procédure progressive, appelée approche matricielle⁵⁵, commençant par la recherche d'éléments génétiques potentiellement présents dans les OGM connus et inconnus (*screening*), suivie par la détection puis la quantification des OGM autorisés. Quand un élément génétique a été détecté mais qu'aucun OGM connu (autorisés ou non) n'a pu être amplifié, la présence d'un OGM inconnu est suspectée. Une tolérance zéro est appliquée pour tout OGM non autorisé ou inconnu.

La détection des OGM connus autorisés et non autorisés peut également désormais être réalisée par des approches NGS permettant la comparaison des séquences à des génomes de référence de la même espèce⁵⁶ ou à des bases de données de transgènes connus⁵⁷. Les transgènes ne représentant qu'une très faible portion du génome, une forte profondeur de séquençage est requise pour leur détection, d'autant plus s'ils sont présents en faibles quantités dans les échantillons⁵⁸. Pour réduire les coûts et la difficulté d'analyses des données sur génome complet, le séquençage peut aussi être restreint à des zones spécifiques du génome après des étapes d'enrichissement ou de capture par hybridation sur sondes⁵⁹. Dans ce cas, un minimum d'information initiale sur la construction est alors nécessaire.

Récemment des techniques ont été développées pour obtenir la séquence de l'insert et des fragments de bordure d'OGM inconnus. Une fois amplifiés, les fragments sont séquencés par des approches NGS de type nanopore, rapides et efficaces pour les fragments longs. Les étapes d'amplification de ces méthodes peuvent varier. L'une d'elle, applicable aux plantes, est fondée sur la circularisation de fragments, puis leur amplification par PCR inverse⁶⁰ grâce à des amorces s'hybridant dans des éléments génétiques communément utilisés pour le

⁵³ Broccanello, C., Chiodi, C., Funk, A. *et al.* Comparison of three PCR-based assays for SNP genotyping in plants. *Plant Methods* 14, 28 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0295-6>

⁵⁴ Gerdes, L., Iwobi, A.N., Busch, U., & Pecoraro, S. (2016). Optimization of digital droplet polymerase chain reaction for quantification of genetically modified organisms. *Biomolecular Detection and Quantification*, 7, 9 - 20.

⁵⁵ Verginelli D, Paternò A, De Marchis ML, et al. Development and comparative study of a pat/bar real-time PCR assay for integrating the screening strategy of a GMO testing laboratory. *J Sci Food Agric.* 2020;100(5):2121-2129. doi:10.1002/jsfa.10235

⁵⁶ Holst-Jensen A, Spilsberg B, Arulandhu AJ, Kok E, Shi J, Zel J. Application of whole genome shotgun sequencing for detection and characterization of genetically modified organisms and derived products. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408(17):4595-4614. doi:10.1007/s00216-016-9549-1

Wahler, D., Schauser, L., Bendiek, J., & Grohmann, L. (2013). Next-Generation Sequencing as a Tool for Detailed Molecular Characterisation of Genomic Insertions and Flanking Regions in Genetically Modified Plants: a Pilot Study Using a Rice Event Unauthorised in the EU. *Food Analytical Methods*, 6(6), 1718-1727. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9673-x>

Park, D., Park, S.H., Ban, Y.W. *et al.* A bioinformatics approach for identifying transgene insertion sites using whole genome sequencing data. *BMC Biotechnol* 17, 67 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0386-x>

⁵⁷ Dong, W., Yang, L., Shen, K. *et al.* GMDD: a database of GMO detection methods. *BMC Bioinformatics* 9, 260 (2008). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-260>

⁵⁸ Willems S, Fraiture MA, Deforce D, et al. Statistical framework for detection of genetically modified organisms based on Next Generation Sequencing. *Food Chem.* 2016;192:788-798. doi:10.1016/j.foodchem.2015.07.074

⁵⁹ Debode, F., Hulin, J., Charlotiaux, B. *et al.* Detection and identification of transgenic events by next generation sequencing combined with enrichment technologies. *Sci Rep* 9, 15595 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51668-x>

⁶⁰ Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics.* 1988;120(3):621-623. doi:10.1093/genetics/120.3.621

screening (ex : promoteur 35S)⁶¹. Une autre méthode, la nCATS (*nanopore Cas9 Targeted-Sequencing*), développée sur cellules humaines, utilise l'induction de cassures double-brin par une Cas9 permettant de lier des adaptateurs sur les fragments générés pour le séquençage par nanopore⁶². Cette méthode permet de détecter les variants structuraux ainsi que les mutations simples dans des zones connues (identifiées à partir de données de séquençage et d'expression) où vont s'hybrider les ARN guides associés à la Cas9 mais aussi d'évaluer les profils de méthylation des CpG. Cette dernière stratégie pourrait être appliquée aux plantes en ciblant des éléments génétiques couramment trouvés dans les inserts d'OGM.

Toutes ces techniques de détection d'OGM connus et inconnus ont comme limite de ne pouvoir être utilisables qu'après l'obtention d'un résultat de screening positif ciblant une séquence déjà connue (ex : promoteurs ou terminateurs classiquement utilisés dans les OGM conventionnels).

Pour faciliter l'accès aux informations disponibles sur les OGM, des bases de données sont nécessaires. Des initiatives sont lancées dans ce sens, par exemple la base EUgenius (*EUropean GMO INitiative for a Unified Database System*) développée par le BVL (*Federal Office of Consumer Protection and Food Safety*, GER) et le WFSR (*Wageningen Food Safety Research (formerly RIKILT)*, NL). La mise à jour et la maintenance de ces bases est toujours un challenge. Il sera d'autant plus grand si elles doivent également couvrir un nombre grandissant de produits édités.

4.2. Développement des méthodes de détection des produits ODM, SDN1 et SDN2

Si un phénotype spécifique dans la variété éditée est revendiqué par l'obteneur (morphologie, performances agronomiques, présence de composés cellulaires modifiés...), le détecter dans du matériel où il est déclaré comme présent sera toujours possible mais, comme pour les OGM conventionnels, cela ne pourra servir qu'à des contrôles particuliers (vérification, tri...) sans apporter la preuve formelle de la présence d'un évènement d'obtention spécifique. Pour cela, des méthodes moléculaires fondées sur le génotype seront nécessaires.

A la condition qu'elles soient décrites ou connues, les mutations ponctuelles présentes dans les produits issus d'ODM, SDN1 et SDN2 sont *a priori* parfaitement détectables en utilisant les approches développées pour l'identification spécifique des évènements OGM conventionnels (PCR qualitative/quantitative, puces à ADN, séquençage ciblé ou de type NGS). De même pour les réarrangements chromosomiques et les délétions de grande taille, produits en induisant plusieurs cassures simultanées et qui ne sont pas *stricto sensu* des produits SDN1/SDN2.

Néanmoins, une détection et une quantification précise peuvent s'avérer difficile si la cible consiste en des modifications d'une ou de quelques paires de bases. La spécificité des tests

⁶¹ Boutigny, AL., Fioriti, F. and Rolland, M. Targetted MinION sequencing of transgenes. *Sci Rep* 10, 15144 (2020). doi.org/10.1038/s41598-020-71614-6

⁶² Gilpatrick, T. *et al.* Targeted nanopore sequencing with Cas9 for studies of methylation, structural variants and mutations. *bioRxiv* (2019) https://doi.org/10.1101/604173

développés pour détecter et quantifier les Indels et SNV (*Single nucleotide variants*) présents dans les variétés éditées nécessiterait des modifications. Pour cela, les différentes stratégies utilisées pour les OGM conventionnels peuvent également être appliquées. Les LNA, capables de différencier des cibles ADN ou ARN hautement similaires ont par exemple déjà permis le développement d'une méthode de détection et de quantification de la séquence portée par un colza produit par ODM et rendu tolérant à des herbicides par la mutation d'une seule paire de base⁶³. La ddPCR a aussi été testée avec succès sur cellules humaines éditées⁶⁴, et sera très probablement étendue à la détection des éditions chez les plantes.

Le point clé est qu'aucune de ces méthodes de détection/quantification n'est réellement « spécifique » d'une technique d'obtention, dans le sens où les mutations détectées restent non distinguables de mutations spontanées ou issues de sélection conventionnelle ou de mutagenèse aléatoire. En effet, ces mutations sont toutes produites par les mêmes mécanismes physiologiques de réparation de l'ADN de la cellule végétale et ne sont pas biochimiquement différentes. Sans déclaration préalable, il n'est pas possible à l'heure actuelle de les attribuer sans ambiguïté à un acte d'édition réglementé.

La comparaison d'un génome édité avec des génomes de référence non édités de la même espèce ne permet pas d'établir une spécificité certaine d'origine de la séquence, et en particulier parce que les mutations identifiées lors de l'analyse pourraient être des mutations spontanées ou induites par des techniques non réglementées.

Il apparaît donc techniquement impossible d'imposer aux demandeurs de soumettre des méthodes d'identification et de quantification spécifiques de l'événement, et validées selon les critères de performance, pour les produits issus d'ODM, SDN1 et SDN2 sans insertion d'ADN recombinant, car les mêmes mutations auraient pu être obtenues par des techniques non soumises aux exigences d'étiquetage et de traçabilité.

4.3. Validation des méthodes de détection des produits ODM, SDN1 et SDN2

Dans son rapport de 2019, le réseau ENGL a conclu que les procédures de validation des méthodes de détection établies pour les OGM conventionnels seront inadaptées pour les produits végétaux édités⁶⁵. La principale raison en étant l'impossibilité d'évaluer la spécificité de ces méthodes si leurs cibles peuvent aussi se trouver dans d'autres produits non réglementés.

4.4. Contrôle du marché pour les produits ODM, SDN1, SDN2

Les procédures moléculaires courantes de détection des OGM conventionnels connus et inconnus ne pourront pas être appliquées car elles reposent sur la détection par étapes

⁶³ Chhalliyil, P., Ilves, H., Kazakov, S. A., Howard, S. J., Johnston, B. H., & Fagan, J. (2020). A Real-Time Quantitative PCR Method Specific for Detection and Quantification of the First Commercialized Genome-Edited Plant. *Foods*, 9(9), 1245. <https://doi.org/10.3390/foods9091245>

⁶⁴ Findlay SD, Vincent KM, Berman JR, Postovit LM. A Digital PCR-Based Method for Efficient and Highly Specific Screening of Genome Edited Cells. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153901. Published 2016 Apr 18. doi:10.1371/journal.pone.0153901

⁶⁵ European Network of GMO Laboratories (ENGL), Detection of food and feed plant products obtained by new mutagenesis techniques, 26 March 2019 (JRC116289)

d'éléments génétiques constitutifs des cassettes de transformation qui sont absents dans les plantes éditées par ODM, SDN1 et SDN2. Le screening ne sera plus possible et il faudra dès le début du contrôle passer en revue tous les événements d'édition connus (autorisés ou non) pour lesquels une méthode de détection validée et reconnue par l'UE existe (sans critère d'évaluation de la spécificité, aucune ne le sera)⁶⁶. Pour les événements inconnus, aucune méthode autre que le séquençage complet ne serait adaptée. Et comme rappelé plus haut, la distinction avec la variation naturelle ou la mutagenèse réglementée s'avèrera impossible.

Actuellement, indépendamment du faible nombre d'événements commercialisés déclarés, le contrôle du marché ne pouvant être efficace, la DGCCRF ne réalise à ce jour aucune campagne concernant les variétés végétales éditées.

4.5. L'édition laisse-t-elle des traces reconnaissables ?

Dans le cas de produits ODM, SDN1 et SDN2 sans insertion d'ADN recombinant, par définition, aucune insertion de parties de vecteurs ou d'ADN contaminant ne doit avoir été laissée dans la variété commerciale. Comme rappelé dans l'avis du HCB de 2017, toute présence de matériel exogène implique le statut OGM.

En règle générale, les obtenteurs pratiquent divers contrôles de qualité fondés sur l'analyse de données de séquençage, ils sont réalisés pour cela avant la sortie du matériel sur le marché.

Les produits issus d'ODM, SDN1 et SDN2 présentent des mutations ponctuelles qui, sans information préalable, ne peuvent être actuellement distinguées de celles résultant de la variabilité naturelle au sein de l'espèce concernée, ou de la variabilité induite par des techniques non soumises à évaluation des risques car considérées comme sûres. Les modifications de l'ADN induites par ODM, SDN1 et SDN2 ne présentent pas de caractéristiques suffisamment spécifiques, ni en taille, ni en séquence, ni en localisation au sein du génome, pour permettre de tracer les techniques utilisées pour les produire avec certitude. Aucune signature de ce type n'a été décrite jusqu'ici dans la littérature scientifique.

Par « *machine learning*⁶⁷ », des algorithmes ont été développés dernièrement pour tenter de prédire les mutations produites par le système CRISPR sur des lignées cellulaires humaines et animales (inDELPHI (Shen 2018⁶⁸), FORECasT (Allen 2018⁶⁹)). En fonction de la séquence cible, ces programmes permettent d'identifier le type majoritaire des mutations générées. Par exemple, ces prédictions permettent de connaître à l'avance la séquence de la mutation qui sera présente dans 50% des cas à un site de coupure donné. Les 50% restants étant constitués de mutations variables. Ces informations très utiles pour des applications de thérapie génique ne permettent cependant toujours pas de déterminer de manière fiable si une mutation observée dans un produit/une variété a été produite par CRISPR. Si elle correspond à la

⁶⁶ Pour les produits faisant l'objet d'une déclaration indiquant qu'ils portent un événement édité autorisé par un pays tiers, la détection des mutations par des méthodes non validées ne sera bien évidemment pas reconnue comme officielle.

⁶⁷ Recherche systématique de la meilleure adéquation entre un modèle mathématique et un jeu de données.

⁶⁸ Shen, Max W. et al "Predictable and precise template-free CRISPR editing of pathogenic variants." *Nature* 563, 7733 (November 2018): 646–651 ©2018, Springer Nature Limited.

⁶⁹ Allen, F., Crepaldi, L., Alsinet, C. et al. Predicting the mutations generated by repair of Cas9-induced double-strand breaks. *Nat Biotechnol* 37, 64–72 (2019). <https://doi.org/10.1038/nbt.4317>

mutation majoritaire prédite par le programme, une mutation aurait tout aussi bien pu être produite par une autre méthode que l'édition des génomes, et ceci même si elle n'est pas représentée dans la diversité génétique connue de l'espèce. En comparaison aux génomes de plantes, les génomes animaux sont plus « stables », bien que variables. Les programmes utilisent donc la séquence initiale de la cellule ou de la lignée animale comme référence. Ceci serait plus compliqué pour les végétaux de variabilité et diversité supérieures selon les variétés et espèces. De plus, même s'ils étaient capables de délivrer une information utilisable pour la reconnaissance de la technique utilisée, ces modèles sont dépendants des lignées cellulaires sur lesquelles ils ont été développés et devraient donc être mis au point pour chacune des quelques milliers d'espèces du catalogue. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser ces approches pour prouver l'utilisation de techniques des génomes pour les plantes.

D'autre part, les nucléases sont définies à façon pour atteindre de très nombreuses cibles dans le génome sans autre restriction qu'une accessibilité suffisante de la chromatine et le respect de leurs exigences en termes de fonctionnement (encadrement de la cible par des couples de TALEN, hybridation de l'ARN guide à une distance spécifique de la cible pour la dCas9-cytidine désaminase, etc.) et de nature de séquence autour de la cible (ex : PAM pour les Cas,...) au moment de l'édition. Ces caractéristiques ne sont pas suffisantes pour reconnaître avec certitude la technique utilisée en observant l'environnement des mutations générées. Par exemple, le PAM (*Polymerase Adjacent Motif*) de la Cas la plus utilisée (Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, PAM = NGG) est tellement représenté dans les zones codantes riches en bases GC qu'il serait impossible de le prendre comme preuve de la présence d'une mutation ciblée. D'autre part, la grande diversité des PAM des Cas utilisées actuellement rend leur utilisation comme indice de la présence d'une mutation ciblée non pertinente en détection.

Les mutations hors-cibles dues aux SDN/ODM ne présentent pas de profils particuliers en dehors d'être situées dans des zones présentant une certaine homologie (variable) avec une cible, et ne peuvent donc pas non plus être utilisées pour révéler de manière fiable (certaine) la technique qui leur a donné naissance. De plus, si elles n'ont pas déjà été identifiées et éliminées, elles ne persisteraient plus que dans une proportion très réduite du génome chez les variétés ayant subi des rétrocroisements. Enfin, il est important de rappeler que si l'on ne connaît pas la cible, il est impossible de savoir quelles coupures hors-cible rechercher.

Les mutations induites au cours des procédures de culture *in vitro* (isolement et propagation de cellules, formation de cals et régénération de plantes) sont des variations somaclonales potentiellement visibles mais celles-ci ne sont reliées à aucune technique d'édition particulière. Et elles apparaissent également lors de l'application des techniques classiques de mutagenèse, de la culture de tissus ou peuvent tout aussi bien être déclenchés par un stress biotique ou abiotique.

Les modifications épigénétiques éventuellement, liées à l'utilisation des SDN/ODM lors du passage *in vitro*, ne sont pas non plus assez caractéristiques pour déterminer si une technique d'édition des génomes a été mise en jeu. Elles dépendent de paramètres biologiques très variables, et sont elles-mêmes changeantes dans le temps ou, parfois, selon la position de la plante dans le champ, et ne fournissent donc pas une base d'identification fiable. De plus, ces modifications se caractérisent par une faible stabilité et ne conviennent donc pas aux méthodes de détection de routine, en particulier pour des produits dont la commercialisation

est autorisée après des schémas de sélection incluant un grand nombre de générations de croisements et d'autofécondation au cours desquelles les marques épigénétiques peuvent être perdues ou modifiées.

Si on peut imaginer que l'observation fine de la physiologie et du génome de cellules dans les heures suivant l'édition pourrait dans certains cas révéler des profils caractéristiques d'une méthode ou d'un contexte d'édition donnés (par des approches bio-informatiques fondées sur l'intelligence artificielle par exemple), les caractéristiques identifiées comme pouvant servir de signature à cette méthode de modification des génomes ou à ce contexte d'édition auraient très peu de chances d'être maintenues au cours des nombreuses générations de création et de multiplication des variétés végétales commercialisées. Comme indiqué dans les paragraphes précédents, les étapes suivies par ces variétés tout au long des schémas de sélection et de production des lots qui seront mis sur le marché pourraient leur faire perdre ces caractéristiques, ce qui rendrait totalement inopérante l'analyse.

Enfin, afin de déterminer si l'application de NGT entraîne un plus grand nombre de mutations chez une plante par rapport aux mutations spontanées, il faudrait disposer d'un génome de référence approprié pour chaque variété concernée. Au niveau de précision requis pour l'identification de mutations ponctuelles et en raison du degré élevé de variabilité des génomes végétaux, il ne serait pas approprié d'utiliser un génome représentatif de l'espèce. Les pan-génomes, qui permettent de cartographier la variabilité existante des génomes végétaux stockés dans les bases de données, restent insuffisants en tant que génomes de référence pour l'identification de variétés éditées car ils fluctuent en permanence et doivent constamment être remis à jour.

Un ouvrage récent propose une analyse basée sur des hypothèses prospectives d'utilisation de programmes informatiques qui, combinant des faisceaux de preuves partielles, pourraient permettre de remonter à l'information sur les techniques de modification des plantes. En prenant en compte l'ensemble des éléments que nous venons d'exposer, un programme informatique ne pourrait pas aujourd'hui produire en routine l'information nécessaire à une identification fiable des techniques d'édition, et qui serait utilisable pour la mise en œuvre d'une réglementation.


4.6. Pratiques de détection envisagées


Dans son rapport sur les méthodes de détection des produits issus des NGT⁷⁰, l'ANSES présente des possibilités concernant des techniques d'analyse à moyen terme (PCR en temps réel via une plateforme micro-fluidique, un génotypage SNP, un séquençage de fragments d'intérêt, une étude de la méthylation de l'ADN) et à long terme (séquençage de génomes complets et recherche d'éléments génétiques exogènes, séquençage de génomes complets et approches statistiques, conformation de la chromatine). Elles sont résumées dans le tableau ci-dessous.

⁷⁰ ANSES. Rapport d'appui scientifique et technique : Demande d'appui scientifique et technique des Laboratoires Nationaux de Référence OGM concernant les méthodes de détection des produits issus de NPBT. Juillet 2018.

	Type de modification	PCR temps réel	PCR temps réel microfluidique	Génotypage SNP	Séquençage de fragments d'intérêts	Séquençage de génome complet	Etude de la méthylation de l'ADN	Conformation de la chromatine
Connaissance préalable des modifications	SDN1	D – I – Q	D – I – Q	I	I	I		
	SDN2	D – I – Q	D – I – Q	I	I	I		
	SDN3	D – I – Q	D – I – Q	I	I	I		
	Epigénétique						I	I
Absence de connaissance préalable des modifications	SDN1							
	SDN2							
	SDN3					I		
	Epigénétique						I	I
	Vecteurs et effecteurs	D – I – Q	D – I – Q	I	I	I		

D : détection ; I : identification ; Q : quantification

 Techniquement au point

 En cours de développement, niveau de performance incertain

 Au point sur d'autres applications, niveau de performance incertain


 Non applicable en routine à ce jour

Tableau 1. Tableau récapitulatif des performances actuelles des potentielles techniques d'analyse des produits issus des NGT, selon l'état des connaissances préalables des modifications (Anses, Juillet 2018).

Cette synthèse des possibilités techniques envisagées par l'ANSES montre bien que sans connaissances préalables sur les modifications présentes (partie basse du tableau), il est impossible d'effectuer la détection des mutations potentiellement portées par les produits SDN1 et SDN2 (les cases sont vides, aucune méthodologie n'est disponible).

5. Perspectives

Au terme de cet état des lieux, qui rappelle la combinaison des étapes entre l'obtention d'un caractère et sa commercialisation, il apparaît impossible d'envisager de valider sur un plan réglementaire des techniques de détection de produits SDN1 et SDN2. Comme la Commission européenne l'a noté, ceci pose donc question si les produits issus de ces techniques devaient rester dans le champ des OGM non exemptés.

Comme nous l'avons vu, les difficultés liées à la validation de la spécificité d'identification des techniques par le JRC ne sont pas résolues. Aujourd'hui, si l'on peut détecter une mutation, on ne peut pas, dans l'état actuel des connaissances scientifiques⁷¹, identifier la technique à son origine. Prouver qu'une mutation a été « produite » et non simplement sélectionnée, restera associé à une incertitude impossible à lever, qui, en cas de réglementation des produits de NBT, soulèvera certainement des points de contentieux. La mutagénèse conventionnelle étant répandue, et les génomes végétaux étant en constante évolution, une mutation pourrait avoir été obtenue par sélection ou spontanément. La charge de la preuve incombant au demandeur⁷², il se trouverait bien dépourvu pour en produire une.

⁷¹ Le CS du HCB n'a par ailleurs pas identifié d'avancées qui ouvrent vers une telle perspective.

⁷² S'entend ici comme : la personne qui demanderait que le produit soit reconnu issu de NBT.

Une approche probabiliste dans le domaine végétal serait trop incertaine pour être fiable, en particulier en raison des nombreuses étapes de production et de propagation du matériel biologique avant son arrivée sur le marché. Les schémas de sélection diluent très sensiblement les éventuelles modifications annexes liées aux étapes initiales de l'édition. Et si l'on ne connaît pas la cible, il est impossible de savoir quelles coupures hors-cible rechercher.

Ce rapport est volontairement centré sur les outils de détection. Indispensables à la mise en œuvre de la réglementation, ils ne représentent pour autant qu'un des aspects qui motivent le choix de réglementer. Comme il n'est pas aujourd'hui possible de détecter de différences génétiques entre deux produits obtenus par des méthodes réglementées et non réglementées, la question se pose de leur appliquer un régime différent.

Par ailleurs, la question de la réglementation est plus vaste. Elle couvre d'autres aspects, comme la gestion des risques⁷³ et l'information des consommateurs. Dans son rapport de 2017, le CS du HCB n'a pas identifié de risques intrinsèquement associés aux techniques, ni de risques génériques pour les produits qui en proviennent. Au-delà de questions des modifications des pratiques agronomiques, les risques potentiels identifiés par le CS seraient liés au produit lui-même et à l'objectif recherché par l'obteneur. Un risque identifié ne concernerait donc qu'un caractère donné dans certains produits. Il pourrait faire l'objet d'études spécifiques, ces études seraient un préalable à l'entrée dans le processus d'enregistrement des variétés au catalogue. Pour ce qui est de l'information des consommateurs, mettre en œuvre une réglementation pour des produits biologiquement identiques à d'autres non étiquetés, sans risques sanitaires avérés et dont l'étiquetage reposerait sur des techniques non validées mérite à tout le moins réflexion.

⁷³ La gestion des risques s'entend pour les risques des techniques et les risques commerciaux.

Annexe I Comité scientifique du HCB et élaboration de la synthèse

Cette synthèse a été élaborée par le Comité scientifique (CS) du HCB à partir du travail préparatoire d'un membre de ce dernier (**voir Annexe 2**), examinée en séances du 21 octobre 2021 et du 18 novembre 2021, en présentiel et en visioconférence, sous la présidence du Pr Jean-Christophe Pagès et la vice-présidence du Dr Claudine Franche et du Dr Pascal Boireau, et adoptée en date du 26 novembre 2021 par voie électronique. 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 composé⁷⁴ 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), 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), 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 Vilotte.

⁷⁴ Composition 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, publié le 28 avril 2017 et au décret n°2019-1353 du 12 décembre 2019 puis au décret n°2020-1675 du 23 décembre 2020 prolongeant le mandat des membres du HCB.

Annexe II Groupe de travail du CS et liste des personnes consultées pour l'élaboration de la présente synthèse

Sur décision du bureau, le groupe de travail du Comité scientifique (CS) est composé d'un seul membre du CS, Cécile Collonnier, sélectionnée pour ses compétences en amélioration des plantes notamment. Ses travaux ont été suivis par Jean-Christophe Pagès, Président du Comité scientifique et Président par intérim du HCB, et coordonnés par Lucie Eyraud, chargée de mission auprès du Comité scientifique du HCB.

Le groupe de travail a consulté les experts supplémentaires suivants au titre de leurs expertises, pour compléter ses compétences dans les domaines en lien avec la présente synthèse :

Sur la question des plans de sélection :

- S. Mesnildrey, G. Bonnet, F. Bock, B. Haquin, et S. Iveson, experts en Biotechnologies pour le groupe Syngenta France.
- F. Azanza, responsable des activités R&D Grandes Cultures du Groupe Limagrain (Vilmorin et Cie).
- L. Chauvin et J.E. Chauvin, directeur de l'Unité Expérimentale RGCO (Ressources Génétiques Végétales en Conditions Océaniques), directeur adjoint de l'UMR IGEPP (Institut Génétique Environnement et Protection des Plantes), équipe de Recherche « Résistance et Durabilité », INRAe

Ainsi que R. Blumel, Directrice générale de l'Union française des Semenciers.

Sur les questions de détection moléculaire :

- P. Philipp, Responsable unité scientifique techniques moléculaires d'identification, Service commun des laboratoires, Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des fraudes.
- P. Rogowsky, Expert reproduction et développement des plantes, ENS Lyon.

Jean-Christophe Pagès a également été sollicité pour son expertise en génétique moléculaire.

Le texte de cette synthèse reprend les données de la littérature scientifique.

Les experts externes ont été interrogés et entendus sur les points spécifiques cités ci-dessus dans le cadre des travaux de réflexion mais n'ont pas pris part à la rédaction du rapport.