

Maisons-Alfort, le 29 novembre 2023

AVIS

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

relatif à l'analyse scientifique de l'annexe I de la proposition de règlement de la Commission européenne du 5 juillet 2023 relative aux nouvelles techniques génomiques (NTG) – Examen des critères d'équivalence proposés pour définir les plantes NTG de catégorie 1

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses s'est autosaisie le 6 novembre 2023 pour la réalisation de l'expertise suivante : analyse scientifique de l'annexe I de la proposition de règlement de la Commission européenne du 5 juillet 2023 relative aux nouvelles techniques génomiques (NTG) – Examen des critères d'équivalence proposés pour définir les plantes NTG de catégorie 1.

1. CONTEXTE ET OBJET DE L'AUTOSAISINE

Contexte réglementaire

Depuis l'adoption de la directive 2001/18/CE¹ relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés (OGM) dans l'environnement, les progrès scientifiques et techniques ont conduit au développement de nouvelles techniques de modification génétique. Celles-ci ont fait l'objet de recours juridiques relatif au fait de savoir si le produit de

¹ 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, pp. 1-38.

ces nouvelles techniques relevait de la définition des OGM et du champ d'application de cette directive.

L'arrêt de la Cour de justice de l'Union européenne dans l'affaire C-528/16 (arrêt du 25 juillet 2018) a conclu que les nouvelles techniques de mutagenèse relevaient du champ d'application de cette directive et soulevait des questions pratiques d'applicabilité. A la suite de cet arrêt, le Conseil invitait la Commission à mener une étude concernant le statut des « nouvelles techniques génomiques » (NTG) dans le droit de l'Union (Décision (UE) 2019/1904 du Conseil du 8 novembre 2019).

Dans cette étude du 29 avril 2021, la Commission concluait que la législation actuelle de l'Union européenne (UE) sur les OGM n'était pas adaptée à certaines de ces NTG, formellement définies pour la première fois comme les « techniques capables de modifier le matériel génétique d'un organisme, qui ont émergé ou se sont développées principalement depuis 2001 ». En particulier, cette étude mentionnait le fait que l'évaluation des risques prévue par la législation actuelle avait été jugée parfois inadéquate ou disproportionnée et que les exigences de détection étaient souvent inapplicables pour les plantes et produits de plantes obtenus par des techniques de mutagenèse ciblée² ou de cisgenèse.

Dans ce contexte, la Commission européenne a adopté, le 5 juillet 2023, une proposition de règlement³, visant entre autres à apporter une réponse aux problématiques soulevées par l'émergence de ces nouvelles techniques.

Le périmètre de cette proposition de règlement est limité aux plantes et aux produits de plantes modifiées par certaines NTG, dans le cadre de demandes de dissémination dans l'environnement à toute autre fin que la mise sur le marché (essais au champ) et de demandes d'autorisation de mise sur le marché (AMM) à toutes fins. La proposition de règlement est destinée à constituer une *lex specialis* par rapport à la législation de l'UE sur les OGM. Les règles énoncées dans le règlement sont ainsi destinées à prévaloir sur la législation en vigueur, principalement la directive 2001/18/CE et le règlement (CE) n° 1829/2003⁴ pour ce qui concerne la mise sur le marché de plantes, produits ou éléments de produits issus de ces plantes à des fins alimentaires.

Que prévoit la proposition de règlement ? Parmi les plantes « NTG » relevant de son champ d'application, deux catégories sont distinguées. Les plantes de catégorie 1, mentionnées comme pouvant être équivalentes à des plantes obtenues naturellement ou par sélection conventionnelle, sont définies par des critères d'équivalence aux plantes conventionnelles énoncés en annexe I de la proposition de règlement. Dès lors que leur statut de catégorie 1 serait établi, ces plantes ne seraient plus soumises à la législation de l'UE sur les OGM. *A contrario*, les plantes NTG qui ne sont pas de catégorie 1 sont de catégorie 2 et resteraient soumises à la législation OGM, dans la limite de dispositions et dérogations spécifiques.

² La formulation « mutagenèse ciblée » de la traduction officielle française de la proposition de règlement de la Commission européenne est équivalente à « mutagenèse dirigée » dans d'autres textes.

³ Proposition de règlement du Parlement européen et du Conseil du 5 juillet 2023 concernant les végétaux obtenus au moyen de certaines nouvelles techniques génomiques et les denrées alimentaires et aliments pour animaux qui en sont dérivés, et modifiant le règlement (UE) 2017/625.

⁴ Règlement (CE) n° 1829/2003 du parlement européen et du conseil du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés. JO L 268 du 18.10.2003, pp. 1-23.

Objet de l'autosaisine

Le règlement doit être adopté selon la procédure législative ordinaire, impliquant des débats et votes au sein du Parlement européen et du Conseil. A ce stade de progression de cette proposition, le présent avis vise à éclairer la préparation de cette décision publique. Considérant les délais contraints, l'autosaisine porte sur l'examen des critères d'équivalence mentionnés dans l'annexe I au projet de règlement pour définir les plantes NTG de catégorie 1. Ce point est considéré comme sensible au sein de la proposition législative en tant qu'il institue une nouvelle catégorie de plantes génétiquement modifiées qui seraient exemptées de l'application des exigences de la législation de l'Union européenne sur les OGM, à l'instar des plantes issues de techniques conventionnelles de croisement ou de mutagenèse aléatoire dans le cadre en vigueur.

Périmètre et limitations du champ d'expertise

Cette autosaisine se concentre sur l'analyse des critères envisagés pour conclure à l'équivalence entre certaines plantes NTG et les plantes conventionnelles.

Ces critères, énoncés en annexe I de la proposition de règlement, seront analysés conjointement avec la définition des plantes NTG considérées, en s'appuyant principalement sur le document technique⁵ des services de la Commission européenne du 16 octobre 2023 (désigné ci-après « le document technique »), dans l'objectif de répondre à la question clef suivante : dans quelle mesure les plantes ainsi définies peuvent-elles être effectivement considérées comme équivalentes à des plantes conventionnelles ?

A cette fin, dans un double objectif de clarification et d'analyse scientifique, ces travaux s'attacheront à :

- examiner les critères d'équivalence proposés pour définir les plantes NTG de catégorie 1,
- souligner d'éventuelles questions ou limites dans la définition de ces critères, en examinant leur fondement scientifique et en s'interrogeant sur l'utilité de critères supplémentaires.

La question relative au référentiel d'évaluation des risques des plantes NTG est traitée dans le cadre d'une autre saisine (2021-SA-0019) dont les travaux sont déjà en cours.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

S'agissant d'une analyse scientifique de critères d'équivalence, cette expertise ne constitue pas une expertise en évaluation de risques et sa réalisation a été confiée au groupe de travail (GT) « Biotechnologie ». Celui-ci s'est réuni le 22 novembre 2023 sur la base de rapports initiaux rédigés par trois rapporteurs, experts du GT « Biotechnologie ». Elle a été conduite en se basant sur la proposition de règlement relative aux NTG adoptée le 5 juillet 2023 par la Commission européenne, son annexe I, et le document technique de la Commission

⁵ European Commission services, Regulation on new genomic techniques (NGT) – Technical paper on the rationale for the equivalence criteria in Annex I, 16 Oct. 2023.

européenne présentant une justification des critères énoncés dans cette annexe ainsi que sur des éléments complémentaires jugés nécessaires par les experts du GT « Biotechnologie ».

L'Anses a analysé les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT

L'analyse des critères d'équivalence entre les végétaux NTG et les végétaux conventionnels proposés dans l'annexe I de la proposition de règlement pour définir les plantes qui seraient exemptées de l'application de la législation UE sur les OGM a été réalisée dans un double objectif de clarification et d'analyse scientifique de ces propositions.

3.1. Clarification de l'objectif de l'annexe I « Critères d'équivalence entre les végétaux NTG et les végétaux conventionnels » – définition des termes, des périmètres et des techniques considérés

L'analyse des critères d'équivalence proposés dans l'Annexe I de la proposition de règlement nécessite une phase préalable de clarification de l'objectif recherché, par la définition des termes utilisés puis des périmètres considérés dans les objets comparés, en s'appuyant sur le reste du texte de la proposition de règlement et le document technique de justification des critères émis par la Commission européenne le 16 octobre 2023.

3.1.1. « Critères d'équivalence »

Le considérant 14 de la proposition de règlement indique que les « critères d'équivalence » ont pour objectif de distinguer un sous-ensemble de plantes obtenues par des NTG sur le raisonnement qu'elles auraient pu émerger naturellement ou avoir été produites par des techniques d'obtention conventionnelles. Il s'agit donc de comparer, au sein de ces plantes, les modifications génétiques générées par des NTG avec les variations ou modifications génétiques pouvant émerger naturellement ou résulter de techniques d'obtention conventionnelles, et de définir des critères objectifs et scientifiquement fondés qui permettraient d'assurer que les plantes NTG qui les respecteraient auraient pu effectivement émerger naturellement ou être produites au moyen de techniques d'obtention conventionnelles.

3.1.2. Les « végétaux NTG » considérés dans la proposition de règlement

Pour rappel, les « NTG » ou nouvelles techniques génomiques sont définies dans l'exposé des motifs de la proposition de règlement comme : « une variété de techniques capables de modifier le matériel génétique d'un organisme et qui sont apparues ou ont été mises au point depuis 2001, année de l'adoption de la législation de l'Union sur les organismes génétiquement modifiés (OGM) ».

La formule « **végétal NTG** » utilisée dans la proposition de règlement désigne un sous-ensemble de plantes obtenues par ces NTG. Défini dans l'article 3 de la proposition de règlement, un « végétal NTG » est « un végétal génétiquement modifié obtenu par mutagenèse ciblée ou cisgenèse, ou une combinaison des deux, à condition qu'il ne contienne aucun matériel génétique ne provenant pas du pool génétique des obtenteurs qui aurait pu être inséré temporairement au cours du développement du végétal NTG ».

Cette définition fait référence à un ensemble de techniques d'obtention et un critère d'exclusion, respectivement décrit et analysé dans les sections suivantes.

3.1.2.1. Techniques d'obtention concernées et modifications génétiques associées

Les termes de mutagenèse ciblée et cisgenèse sont définis dans l'article 3 de la proposition de règlement comme :

« **Mutagenèse ciblée** » : « les techniques de mutagenèse causant une ou plusieurs modifications de la séquence d'ADN à des endroits précis du génome d'un organisme » ;

« **Cisgenèse** » : « les techniques de modification génétique causant l'insertion, dans le génome d'un organisme, de matériel génétique déjà présent dans le pool génétique des obtenteurs » ;

avec « pool génétique des obtenteurs » défini dans l'article 3 comme : « la totalité des informations génétiques disponibles dans une espèce et d'autres espèces taxonomiques avec lesquelles elle peut être croisée, y compris au moyen de techniques avancées telles que le sauvetage d'embryons, la polyploidie induite et les croisements par pont ».

Le GT « Biotechnologie » souligne le manque de clarté de la définition du « pool génétique des obtenteurs », en particulier l'utilisation de l'expression « informations génétiques » qui mériterait d'être explicitée. C'est à partir d'autres textes, notamment l'avis de l'Efsa sur la cisgenèse (EFSA GMO Panel, 2012), qu'il a pu être clarifié qu'il était fait référence aux ressources génétiques accessibles aux sélectionneurs pour la sélection variétale d'une espèce donnée et non juste à un pool génétique, ensemble des gènes codants. En d'autres termes, il s'agirait de matériel génétique provenant de l'ensemble des génomes des plantes avec lesquelles la plante considérée peut se croiser, que ce soit naturellement ou au moyen de techniques d'obtention conventionnelles plus ou moins avancées, hors du champ d'application de la directive 2001/18/CE.

Ainsi, la proposition de règlement se réfère non pas à des techniques définies de modification génétique mais aux caractéristiques de leur produit final, dans lequel des modifications génétiques particulières ont été générées, à savoir :

- des mutations ciblées (restreintes à des modifications de la séquence d'ADN à des endroits précis du génome, ce qui exclut les modifications de l'épigénome ou de l'ARN) ;
- une insertion de matériel génétique provenant du pool génétique des obtenteurs.

Pour analyser la pertinence des critères de l'Annexe I, le GT « Biotechnologie » estime nécessaire de recenser les techniques capables de générer ces modifications génétiques, afin d'être en mesure d'appréhender l'ensemble des modifications génétiques qu'elles sont susceptibles de générer, intentionnelles comme non intentionnelles.

3.1.2.1.1. Techniques de mutagenèse ciblée (ou dirigée)

La mutagenèse ciblée peut être réalisée par un ensemble de techniques qui ont émergé dès la fin des années 1990, se développent depuis le début des années 2000 et qui ne cessent de s'améliorer en termes de facilité de mise en œuvre, l'efficacité de la précision des modifications désirées et de minimisation des effets non désirés dans un nombre grandissant d'espèces de plantes.

Il convient donc de noter que cette analyse est réalisée au regard des seules techniques disponibles aujourd'hui, sachant que les progrès scientifiques et techniques devront être pris en compte.

Selon l'état de l'art publié par le Centre commun de recherche (*Joint Research Centre, JRC*) de la Commission européenne en 2021 (Broothaerts *et al.*, 2021), qui a proposé une nouvelle classification des NTG en quatre groupes, les techniques de mutagenèse ciblée au sens de la proposition de règlement, c'est-à-dire les techniques capables de générer des modifications de la séquence d'ADN à des endroits précis du génome, incluent :

- les techniques de Groupe 1, reposant sur différents mécanismes de réparation de l'ADN après induction ciblée d'une cassure double-brin. Elles comprennent toutes les techniques utilisant des nucléases dirigées (*site-directed nucleases, SDN*), dans des applications restreintes, dans le cas de la mutagenèse ciblée, aux usages SDN-1 et SDN-2⁶, et d'autres techniques plus récentes utilisant des recombinases dirigées (*site-specific recombinases, SSR*) ;
- les techniques de Groupe 2, reposant sur une réparation de l'ADN après induction d'une cassure simple-brin ou sur un autre mécanisme n'impliquant pas de cassure d'ADN. Ces techniques mettent en œuvre des SDN dont la nucléase a été modifiée (*base editing, prime editing*) ou reposent sur l'utilisation d'un oligonucléotide (*oligonucleotide-directed mutagenesis, ODM*), dont l'efficacité peut par ailleurs être améliorée par l'utilisation concomitante de SDN du Groupe 1.

Les techniques des Groupes 3 et 4 décrites par le JRC concernent respectivement des modifications de l'épigénome et de l'ARN et se situent donc hors du périmètre de la définition utilisée dans la proposition de règlement pour la mutagenèse ciblée.

Selon différents mécanismes, décrits en détail dans le rapport du JRC, ces techniques peuvent être utilisées pour générer, de façon intentionnelle, différents types de mutations ciblées, comme des substitutions d'une à plusieurs bases, de petites insertions ou délétions (indels), ou de plus grandes délétions (par l'utilisation de cibles aux extrémités flanquant l'intervalle à éliminer) (Broothaerts *et al.*, 2021) (Tableau 1).

Leur mise en œuvre est susceptible de générer concomitairement des modifications non désirées, à la cible mais également hors cible, de différentes natures et à différentes fréquences selon les techniques (Broothaerts *et al.*, 2021) (Tableau 1).

Dans une revue sur les effets non désirés des techniques reposant en particulier sur des CRISPR-Cas⁷, des modifications non désirées ont été rapportées sur le site spécifiquement

⁶ Conditions d'application particulières des SDN, résultant en des mutations ponctuelles ou des insertions/délétions de quelques nucléotides, sans insertion d'ADN exogène. Ces mutations ciblées peuvent être soit aléatoires, non pré-déterminées (SDN-1), soit pré-déterminées, par l'ajout d'une matrice de réparation (SDN-2).

⁷ CRISPR : Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées (clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Cas : CRISPR protéine associée (associated protein).

ciblé (de petites substitutions ou indels) ou hors du site mais dans le gène ciblé (essentiellement des délétions de différentes tailles) (Sturme *et al.*, 2022) (Tableau 1).

Hors cible, des modifications génétiques non intentionnelles peuvent être générées par manque de spécificité dans des sites possédant un certain degré d'homologie avec la cible. Cette même revue a rapporté l'occurrence de petites indels et substitutions d'un nucléotide dans les sites présentant une homologie avec la cible (Sturme *et al.*, 2022) (Tableau 1).

D'autres modifications génétiques non intentionnelles hors cible ont été rapportées ailleurs dans le génome, avec par exemple des éléments transgéniques résiduels au site d'insertion temporaire des effecteurs des modifications ciblées (voir plus loin), ou encore des éléments de séquences du vecteur de transformation (Sturme *et al.*, 2022) (Tableau 1).

3.1.2.1.2. Techniques de cisgenèse (au sens du règlement)

La définition de la cisgenèse figurant à l'article 3 de la proposition de règlement nécessite d'être explicitée davantage. En effet, l'exposé des motifs précise que la cisgenèse considérée dans la proposition de règlement inclut l'intragenèse :

[Cisgenèse] : « Insertion de matériel génétique (par exemple, un gène) dans un organisme récepteur à partir d'un donneur sexuellement compatible (croisable). Le matériel génétique exogène peut être introduit sans (cisgenèse) ou avec des modifications/réarrangements (intragenèse). »

Ce qui n'est pas le cas dans la définition de la cisgenèse considérée par défaut par l'Efsa (EFSA GMO Panel, 2022) et par le JRC (Broothaerts *et al.*, 2021).

Le considérant 2 précise également : « Les techniques de cisgenèse consistent à insérer, dans le génome d'un organisme, du matériel génétique déjà présent dans le pool génétique des obtenteurs. L'intragenèse est un sous-ensemble de la cisgenèse qui consiste à insérer dans le génome une copie réarrangée du matériel génétique composé de deux ou plusieurs séquences d'ADN déjà présentes dans le pool génétique des obtenteurs. »

Le GT « Biotechnologie » estime que l'inclusion de l'intragenèse dans la cisgenèse mériterait d'apparaître dans la définition de la cisgenèse donnée au point 5 de l'article 3 du règlement. Par ailleurs, le GT souligne que désigner de la même façon le tout et l'une de ses parties peut être source de confusion.

Le GT « Biotechnologie » note également que la définition de cisgenèse considère l'insertion de « matériel génétique » et non d'un gène ou d'une unité d'expression complète codant une protéine, une évolution de définition également prise en compte par l'Efsa (EFSA GMO Panel, 2012, 2022).

Enfin, il convient de noter que la proposition de règlement, telle que rédigée, s'applique à l'ensemble des produits de cisgenèse, qu'ils aient fait l'objet de ciblage ou non.

Le GT « Biotechnologie » constate qu'en l'absence de ciblage, les techniques de cisgenèse/intragenèse ne sont pas considérées comme des NTG par le JRC (Broothaerts *et al.*, 2021).

Ainsi, les techniques capables de cisgenèse au sens de la proposition de règlement incluent :

- l'ensemble des techniques de transformation génétique établies, capables d'insérer du matériel génétique exogène de façon aléatoire dans le génome (technique de transformation au moyen d'*Agrobacterium tumefaciens* ou *rhizogenes*, transformation biolistique, etc.), du moment que ce matériel génétique provient du pool génétique des

obtenteurs, qu'il soit inséré à l'identique (séquence cisgénique) ou avec réarrangements (séquence intragénique),

- les techniques de transformation génétique permettant l'insertion ciblée d'une séquence cisgénique ou intragénique, à savoir :
 - les techniques de transformation classiques au moyen d'*Agrobacterium*, appliquées à une plante dans laquelle un site d'atterrissage prédéterminé aura été préalablement inséré, caractérisé et sélectionné,
 - les NTG de Groupe 1 reposant sur des SDN appliquées dans un usage SDN-3, c'est-à-dire qui permet l'insertion d'une séquence exogène dans le génome, ainsi que d'autres mécanismes, comme les SSR,
 - parmi les NTG de Groupe 2, la technique de *prime editing* est, selon l'Efsa, la seule qui permette d'insérer des séquences relativement longues (ne dépassant toutefois pas les 100 pb) susceptibles de générer une cisgenèse. Récemment mise au point, une variante de cette technique (TwinPE) permet d'insérer des séquences encore plus longues (Anzalone *et al.*, 2022 ; EFSA GMO Panel, 2022).

Par ailleurs, ces NTG de Groupe 1 et 2 peuvent permettre de définir la cible de la cisgenèse de telle sorte que la séquence cisgénique soit insérée au site du gène orthologue, possiblement en substituant l'allèle d'origine par le nouvel allèle le cas échéant.

Ces techniques sont celles considérées par l'Efsa dans l'actualisation de son avis sur les plantes développées par cisgenèse et intragenèse (EFSA GMO Panel, 2022).

Au vu du critère 5, il semblerait que d'autres techniques, comme celles de mutagenèse ciblée de type SDN-2 ou d'insertion/substitution plus larges d'éléments de gène, puissent également être considérées comme générant de la cisgenèse au sens du règlement, en ce qu'elles permettraient de modifier ou convertir une séquence endogène en une autre séquence du pool génétique des obtenteurs, quel que soit le type de modification réalisée (voir analyse des critères).

Comme pour la mutagenèse ciblée, certaines de ces techniques peuvent nécessiter l'insertion d'effecteurs dans le génome en étape intermédiaire, dont il faudra s'assurer qu'ils auront été totalement éliminés une fois la modification désirée effectuée (voir critère d'exclusion 3.1.2.2.).

Ces différentes techniques sont listées selon leur potentialité de cisgenèse et leurs possibles effets non désirés dans le Tableau 1.

Avis de l'Anses
Saisine n° 2023-AUTO-0189
Saisine liée n° 2021-SA-0019

Tableau 1. Tableau récapitulatif des NTG capables de mutagenèse ciblée et cisgenèse, avec la mention des modifications génétiques qu'elles peuvent générer de façon intentionnelle, et qu'elles sont susceptibles de générer de façon non intentionnelle.

	Modifications génétiques désirées ¹ parmi les modifications considérées dans la proposition de règlement						Possibles modifications génétiques non désirées ² (occasionnellement observées, à différentes fréquences, dans l'utilisation de ces techniques)			
	Mutagenèse ciblée			---	Cisgenèse		Modifications non désirées à la cible	Modifications non désirées hors cible		
				(Intermédiaire entre mutagenèse ciblée et cisgenèse)			sur le site ciblé ou dans le gène ciblé	sur des sites présentant une homologie avec la cible	Présence d'éléments transgéniques	Autres modifications
	Substitutions d'une ou plusieurs bases	Petites et moyennes Insertions/délétions	Larges délétions (flanquées de 2 sites de mutagenèse ciblée)	Modifications au sein d'un gène résultant en un cisgène	Substitution d'un gène endogène par un cisgène	Insertion hors d'un gène endogène (ciblée ou non)	Substitutions d'une ou plusieurs bases, petites et moyennes insertions/délétions, plus larges délétions	Substitutions d'une ou plusieurs bases, petites et moyennes insertions/délétions, plus larges délétions	Eléments résiduels d'effecteurs de modifications ciblées, éléments de vecteur de transformation, marqueurs...	Substitutions d'une ou plusieurs bases, petites et moyennes insertions/délétions, variations structurales
SDN-1	(non pré-déterminées) 1 bp (2-4 bp)	(non pré-déterminées) 1-4 bp (<100)	Oui	Non	Non	Non	rapportées	rapportées	rapportées	rapportées
SDN-2	1 bp 2-4 bp > 4 bp	1-4 bp > 4 bp	Non	Oui	Non	Non	rapportées	rapportées	rapportées	rapportées
ODM	1 bp 2-4 bp	1-4 bp	Non	Oui	Non	Non	(non analysées) ³	(non analysées)	non applicable (pas de transformation)	(non analysées)
Base editing	1 bp	Non	Non	Oui	Non	Non	non rapportées ⁴	rapportées	non rapportées	non rapportées
Prime editing	1 bp 2-4 bp	1-4 bp <100	Oui ⁵	Oui ^{5,6}	Oui ^{5,6}	Oui ^{5,6} (ciblée)	(non analysées)	(non analysées)	(non analysées)	(non analysées)
Site-specific recombination (SSR)	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui (ciblée)	(non analysées)	(non analysées)	(non analysées)	(non analysées)
SDN-3	Non	Non	Non	Oui	Oui	Oui (ciblée)	potentielles ⁶	potentielles ⁶	potentielles ⁶	potentielles ⁶
Transformation par Agrobacterium sur site d'atterrissage prédéterminé	Non	Non	Non	Non	Non	Oui ⁶ (ciblée)	potentielles ⁶	non applicable (a priori pas d'autres séquences similaires à la cible)	potentielles ⁶	potentielles ⁶
Techniques de transformation classique	Non	Non	Non	Non	Non	Oui ⁶ (non ciblée)	non applicable (pas de cible)	non applicable (pas de cible)	potentielles ⁶	potentielles ⁶

1. Information principalement remplie à partir de l'état de l'art du JRC sur les NTG (Broothaerts et al., 2021) ; 2. Information principalement remplie à partir de la revue systématique de littérature sur les effets non désirés de la mutagenèse ciblée par CRISPR/Cas de Sturme et collègues (2022) ; 3. Indique que l'information, hors du périmètre des publications consultées, n'a pas été analysée par le GT "Biotechnologie" ; 4. Modifications non rapportées dans l'analyse de Sturme et al. (2022) ; 5. Anzalone et al. (2022) ; 6. EFSA GMO Panel (2022).

SDN: site-directed nuclease (nucléases dirigées), incluant les protéines à doigts de zinc (ZFN, Zinc-Finger Nucleases), les méganuclease (MN), les nucléases TALE (TALEN, Transcription Activator-Like Effector Nucleases) et les CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats with associated protein) ; SDN-1 et SDN-2 : conditions d'application particulières des SDN, résultant en des mutations ponctuelles ou des insertions/délétions de quelques nucléotides, sans insertion d'ADN exogène. Ces mutations ciblées peuvent être soit non pré-déterminées (SDN-1), soit pré-déterminées (SDN-2) ; SDN-3 : conditions d'application particulières des SDN, résultant en l'insertion d'une séquence exogène ; ODM: oligonucleotide-directed mutagenesis.

3.1.2.1.3. Question des techniques de transgénèse classiques

Le GT « Biotechnologie » souligne que même si les techniques de transgénèse classiques ne sont pas mentionnées dans les techniques d'obtention considérées par la définition du végétal NTG, ce sont encore des techniques couramment utilisées en étape intermédiaire de la majorité des applications de NTG chez les plantes pour permettre l'expression des effecteurs à l'œuvre dans la réalisation des modifications ciblées (ex. cassette de type CRISPR-Cas).

Les inserts doivent être éliminés une fois la modification ciblée effectuée pour plusieurs raisons, notamment (1) pour augmenter la spécificité de la technique, leur expression prolongée ayant été associée à une augmentation de la probabilité de modification hors cible, (2) pour réduire les risques potentiellement associés à l'insertion aléatoire de matériel génétique étranger dans le génome, et (3) d'un point de vue réglementaire, la présence d'éléments transgéniques dans la plante en fait une plante transgénique, assujettie à l'application des exigences de la législation OGM de l'UE.

L'élimination de ces inserts peut se faire par ségrégation génétique et sélection, dans la descendance, de plantes débarrassées de ces inserts ou, quand les croisements ne sont pas possibles (cas des plantes à reproduction végétative) ou pas avantageux (cas des plantes à cycles de reproduction particulièrement longs), par d'autres techniques comme des techniques d'excision (ex : système Cre/lox).

Des alternatives à l'insertion temporaire des effecteurs sont possibles sans étape de transgénèse (par ex., par l'utilisation de complexes ribonucléoprotéiques (RNP)) (He *et al.*, 2021).

3.1.2.2. Critère d'exclusion de matériel génétique étranger de l'ensemble du génome

La définition du végétal NTG contient un critère d'exclusion de matériel génétique étranger de l'ensemble du génome : « à condition qu'il ne contienne aucun matériel génétique ne provenant pas du pool génétique des obtenteurs qui aurait pu être inséré temporairement au cours du développement du végétal NTG ».

Ce critère concerne notamment :

- des éléments transgéniques résiduels d'effecteurs de NTG insérés en étape intermédiaire de la modification ciblée,
- des éléments transgéniques résiduels de marqueurs éventuellement utilisés en étape intermédiaire de la cisgénèse ou de l'intragenèse,
- des éléments transgéniques provenant du vecteur de transformation (utilisé lors d'une transformation en étape intermédiaire des NTG ou lors d'une transformation classique mise en œuvre lors d'une cisgénèse non ciblée), qui n'ont jamais été destinés à être insérés en premier lieu.

Le GT « Biotechnologie » considère que si ce matériel génétique a effectivement été inséré « temporairement », il ne devrait plus être présent dans le végétal NTG. Cette mention n'ajoutant rien à la condition présentée, il recommande de supprimer cette précision (fin de la phrase après obtenteurs).

Bien que non mentionné dans l'annexe I, ce critère figure parmi les points que le demandeur doit démontrer dans la procédure de vérification du statut des plantes NTG de catégorie 1 (Article 6 de la proposition de règlement).

3.1.3. Les « végétaux conventionnels » selon la proposition de règlement

Aucune définition correspondant à l'expression « végétaux conventionnels » ne se trouve dans le projet de règlement. Cependant, dans sa présentation des critères d'équivalence, le considérant 14 évoque des « végétaux apparaissant naturellement ou produits au moyen de techniques d'obtention conventionnelles », expression qui pourrait s'avérer correspondre à ce que la proposition de règlement entend par « végétaux conventionnels » dans l'Annexe I.

La variation naturelle étant la première source de variabilité génétique utilisée en sélection variétale, le GT estime cohérent qu'elle soit considérée en conjonction avec les techniques d'obtention conventionnelles. Cependant, la proposition de règlement ne donne pas non plus de définition des techniques d'obtention conventionnelles considérées dans cette proposition.

Le GT constate toutefois que la mutagenèse aléatoire en fait partie, comme précisé dans le rapport d'analyse d'impact⁸ : « *An umbrella term used to describe conventional breeding techniques based on mutagenesis that have been used since the 1950s; they involve irradiation or treatment with chemicals in order to produce random mutations in a genome, and typically involve screening of a large number of mutants to select one with desirable properties.* »

Le GT note par ailleurs que l'analyse de la littérature scientifique sur les mutations émergentes naturellement et obtenues par des techniques d'obtention conventionnelles présentée dans le document technique pour justifier les critères d'équivalence de l'Annexe I se base en grande partie sur les mutations causées par les techniques de mutagenèse aléatoire. Le GT rappelle que, selon la directive 2001/18/CE, la mutagenèse (aléatoire) est une technique de modification génétique produisant des organismes exclus du champ d'application de cette directive au titre l'Annexe IB. Dans la mesure où le mécanisme de la catégorisation des NGT dans ce projet de règlement est établi à partir d'une comparaison aux « végétaux conventionnels », il apparaît au GT tout à fait nécessaire qu'ils soient explicitement définis.

3.1.3.1. Différentes sources de variabilité génétique en sélection variétale

La sélection variétale, qui fait partie des techniques d'obtention considérées comme conventionnelles, dépend en grande partie de la variabilité génétique disponible. Les mutations participent à la création de cette diversité génétique via des changements ponctuels ou structurels de la séquence d'ADN nucléaire ou cytoplasmique.

Les mutations spontanées sont provoquées par des erreurs de copie de l'ADN lors de la division cellulaire, des irradiations, des stress chimiques ou physiques, voire des attaques parasitaires (Quiroz *et al.*, 2023). Le taux de mutation spontanée est variable selon la nature de la mutation. Pour les substitutions et les petites indels, le taux de mutation est compris entre 10^{-8} et 10^{-10} chez les plantes (Quiroz *et al.*, 2023), soit environ 1 mutation tous les 100 millions de paires de base à chaque génération (les transitions étant cependant plus fréquentes que les transversions).

⁸ Impact assessment report of 5 July 2023 accompanying the document Proposal for a regulation of the European Parliament and of the Council on plants obtained by certain new genomic techniques and their food and feed, and amending Regulation (EU) 2017/265.

Les indels de motifs répétés de type microsatellites se produisent à une fréquence beaucoup plus élevée, de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-3} par génération. A l'inverse, les indels de grande taille et les autres types de variation structurale (inversion, duplication, transpositions) semblent beaucoup moins fréquentes mais l'estimation de leur taux d'apparition reste difficile (Quiroz *et al.*, 2023). Chez les plantes, beaucoup de ces variations structurales sont causées par l'activité d'éléments transposables. Chez certaines plantes comme le maïs, ces éléments peuvent représenter une part importante du génome (Gill *et al.*, 2021).

Le nombre de variations génétiques qui se maintient dans les populations naturelles résulte d'un équilibre entre les processus qui tendent à augmenter la variation (mutations et migrations entre populations différentes), et ceux qui tendent à la diminuer (la dérive génétique et la sélection naturelle) (Charlesworth and Charlesworth, 2010).

La diversité génétique présente dans une espèce sélectionnée résulte ainsi de l'action conjointe des phénomènes de mutation, dérive génétique, sélection et migration. Le sélectionneur a partiellement accès à cette diversité génétique via les centres internationaux de ressources génétiques, lesquels regroupent des accessions de variétés cultivées et d'écotypes sauvages. Il peut également chercher à introduire la diversité génétique provenant des espèces apparentées sexuellement compatibles par hybridation interspécifique.

Quand la diversité génétique accessible n'est pas suffisante dans l'espèce ou ses apparentées pour sélectionner un caractère donné, de la diversité génétique supplémentaire peut être induite 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 (HCB, 2020).

3.1.3.2. Techniques d'obtention conventionnelles et variabilité génétique associée

Les méthodes et techniques d'obtention conventionnelles peuvent être considérées comme appliquées depuis les débuts de la domestication des plantes, lorsque des populations humaines ont commencé à cultiver certaines des plantes qu'elles récoltaient pour se nourrir et qu'une sélection différente de la sélection naturelle a opéré, conduisant à la fixation des traits dits de domestication. Différentes méthodes se sont ensuite développées et ont pu être plus ou moins combinées (la sélection phénotypique ; l'utilisation des croisements contrôlés ; le transfert de gènes à effet majeur par rétro-croisement ou hybridation inter-spécifique ; la sélection assistée par marqueurs ; la sélection génomique. D'autres méthodes incluent la modification de la ploïdie, ou la synthèse d'espèces allopolyploïdes) (Gallais, 2019).

Une grande partie de ces techniques conventionnelles n'utilise pas de connaissances à l'échelle moléculaire sur la variation génétique mobilisée, ou bien uniquement sous forme d'association statistique avec des marqueurs. La variation génétique qui résulte des méthodes conventionnelles ne peut alors être décrite qu'*a posteriori* (ex. séquençage des génomes).

S'agissant des traits quantitatifs, la sélection conventionnelle peut conduire sur le long terme à des modifications phénotypiques de grande ampleur, mobilisant probablement de nombreux gènes ainsi que des mutations spontanées.

S'agissant des traits mono- ou oligo-géniques, des modifications phénotypiques de grande ampleur peuvent être introduites instantanément par croisements, qui doivent cependant être suivis de rétro-croisements. Plus le nombre de gènes sous-jacents au trait est important, plus

il devient difficile de cumuler les allèles favorables dans un même génotype et plus il y a de risque d'introduire du matériel génétique non souhaité par « auto-stop » des mutations génétiquement liés. Certaines techniques particulières produisent des modifications majeures des génomes, allant de la modification de la ploïdie à la synthèse de génomes nouveaux.

Les études de pan-génomique décrivent la nature et le nombre des variations génétiques dans les plantes cultivées. Les nombres de substitutions et de petites indels sont de l'ordre du million, tandis que le nombre de variants structuraux serait plutôt de l'ordre de 100 000 à 10 000. La majorité des indels sont d'une taille de l'ordre du kb. Des variations structurales de très grande taille (inversions, translocations, duplications) sont également observées mais beaucoup moins fréquentes. La variation de présence-absence des gènes est significative chez toutes les espèces, avec environ 30 % à 60 % de « *core genes* » conservés dans toutes les variétés.

L'hétérogénéité de la variation génétique le long des génomes s'explique par l'hétérogénéité des pressions de sélection sur les gènes. Les régions entourant des gènes fortement sélectionnés sont appauvries en variation, particulièrement lorsque l'événement de sélection est récent et le taux de recombinaison faible (phénomène dit de balayage sélectif). Chez les allopolyploïdes, les différents génomes peuvent avoir des niveaux de variations génétiques différents. Les « *cores genes* » sont des gènes essentiels probablement conservés par la sélection purifiante, tandis que les gènes facultatifs ont un rôle important dans la variation phénotypique entre variétés pour des traits adaptatifs tels que les résistances aux maladies.

Concernant la mutagenèse aléatoire, la nature des mutations induites diffère selon la technique utilisée. La mutagenèse par méthanesulfonate d'éthyle (*ethyl methanesulfonate*, EMS) induit principalement les transitions G/C et A/T (Szurman-Zubrycka *et al.*, 2023). Chez le riz, Li *et al.* (2016) observent que la mutagenèse par irradiation induit davantage de transversions, en particulier C/T, qu'observé entre variétés non mutagénisées. En comparaison de la méthode EMS, l'irradiation induit davantage de variations structurales, l'irradiation à neutrons rapides produit ainsi une forte proportion de délétions (Wang *et al.*, 2012).

La description de populations de TILLING⁹ chez diverses plantes cultivées a permis de caractériser le nombre de mutations obtenues par traitement EMS (Jacob *et al.*, 2018 ; Szurman-Zubrycka *et al.*, 2023). Typiquement, la mutagenèse aléatoire par EMS permet d'obtenir 1 mutation tous les 100 à 1000 kb à condition d'opérer sur des populations de grande taille, de 1000 à 10 000 individus. Il est donc théoriquement possible d'obtenir au moins 1 mutation sur chaque gène. Ces chiffres sont cependant variables selon les espèces et selon les niveaux de ploïdie. Une étude en particulier montre que des nombres de mutations considérablement plus élevés peuvent être obtenus par mutagenèse EMS chez le blé tétraploïde : en moyenne 2705 mutation par lignée, 35 mutations par kb et chez le blé hexaploïde : en moyenne 5351 mutations par lignée, 39 mutations par kb. Pour cette étude les mutations n'ont été recherchées que dans l'exome (Krasileva *et al.*, 2017). La distribution des mutations semble uniforme sur le génome chez le riz (Li *et al.*, 2016) et uniforme entre régions géniques et non géniques chez le blé (Krasileva *et al.*, 2017).

⁹ *Targeted Induced Local Lesions IN Genomes* (TILLING) : technique de sélection conventionnelle permettant de sélectionner des mutants porteurs de mutations d'intérêt par une analyse moléculaire à haut débit d'une banque d'ADN de descendants d'un génotype traité avec un agent mutagène.

3.2. Analyse des critères d'équivalence proposés dans l'Annexe I

3.2.1. Énoncé des critères d'équivalence entre les végétaux NTG et les végétaux conventionnels

L'annexe I de la proposition de règlement du 5 juillet 2023 relative aux NTG énonce les *Critères d'équivalence entre les végétaux NTG et les végétaux conventionnels* ainsi :

*Un végétal NTG est considéré comme équivalent à un végétal conventionnel lorsqu'il diffère du végétal récepteur/parental d'un **maximum de 20 modifications génétiques** des types visés aux points 1 à 5, dans toute séquence d'ADN partageant une similarité de séquence avec le site ciblé qui peut être prédite au moyen d'outils bio-informatiques.*

- 1) *substitution ou insertion de 20 nucléotides au maximum;*
- 2) *délétion de tout nombre de nucléotides;*
- 3) *à condition que la modification génétique n'interrompe pas un gène endogène:*
 - a) *insertion ciblée d'une séquence d'ADN contiguë existant dans le pool génétique de l'obteneur;*
 - b) *substitution ciblée d'une séquence d'ADN contiguë existant dans le pool génétique de l'obteneur à une séquence d'ADN endogène;*
- 4) *inversion ciblée d'une séquence de tout nombre de nucléotides;*
- 5) *toute autre modification ciblée de toute taille, à condition que les séquences d'ADN qui en résultent soient déjà présentes [éventuellement avec les modifications acceptées conformément aux points (1) et/ou (2)] dans une espèce du pool génétique des obtenteurs.*

3.2.2. Analyse par critère

En préambule de cette analyse par critères, le GT indique que les qualificatifs d'« acceptable » et de « tolérable » utilisés pour désigner certains paramètres, seuils ou modalités associés à des critères ont trait à la robustesse de la comparaison, i.e. sa capacité à effectuer une classification exacte entre les deux catégories de NTG par rapport aux définitions de ces catégories, et non à l'acceptabilité ou la tolérabilité des plantes NTG ainsi catégorisées.

3.2.2.1. Critère 0 - Conditions générales

*Un végétal NTG est considéré comme équivalent à un végétal conventionnel lorsqu'il diffère du végétal récepteur/parental d'un **maximum de 20 modifications génétiques** des types visés aux points 1 à 5, dans toute séquence d'ADN partageant une similarité de séquence avec le site ciblé qui peut être prédite au moyen d'outils bio-informatiques.*

■ Clarification

Cette phrase présente les conditions générales applicables aux plantes NTG de catégorie 1. Selon sa compréhension de cette proposition, le GT « Biotechnologie » en retient les points clefs suivants :

- les conditions concernent exclusivement un site ciblé ainsi que les séquences d'ADN similaires, prédictibles au moyen d'outils bio-informatiques ;
- un seuil maximal de 20 modifications génétiques y est accepté ;
- la nature de chacune de ces modifications génétiques doit correspondre à l'un des types exposés dans les points développés ensuite.

Selon sa compréhension du seuil proposé, le GT propose de clarifier la formulation : « lorsqu'il diffère (...) d'un maximum de » par : « qui ne diffère pas de plus de ». Ainsi, la phrase peut être reformulée de façon plus directement compréhensible : « Est considéré comme équivalent à un végétal conventionnel tout végétal NTG qui ne diffère pas du végétal récepteur/parental de plus de 20 modifications génétiques (...) ».

■ Techniques concernées

Ces conditions générales s'adressent *a priori* à l'ensemble des techniques d'obtention possibles d'un végétal NTG, à savoir les techniques capables de mutagenèse ciblée et de cisgenèse (incluant l'intragenèse). La focalisation sur des séquences partageant une similarité avec un site ciblé suggère que les techniques non ciblées ne sont pas concernées par ces conditions. Ce point sera discuté dans les commentaires.

■ Commentaires

- Définition du « site ciblé » :

Aucune précision n'est apportée sur le « site ciblé » dans la proposition de règlement. Le GT « Biotechnologie » estime que la définition de ce site est déterminante dans l'application de chacun des critères proposés.

Deux aspects doivent être considérés : (1) la région qui sera utilisée pour identifier des séquences similaires susceptibles d'être modifiées non intentionnellement par manque de spécificité de la technique, et (2) la région dans laquelle seront recherchées les modifications génétiques des différents types listés dans les points suivants. Les deux aspects pourraient être dissociés dans une définition composite : (1) une séquence restreinte autour du site de ciblage pour la recherche de similarité de séquence, et (2) une séquence plus large, adaptée à la recherche de modifications génétiques associées.

Concernant la séquence du site utilisée pour la recherche de similarité : le GT estime que, considérant l'hétérogénéité des techniques potentiellement mises en œuvre, il semblerait peu pertinent de fixer une taille standard pour les séquences considérées dans chaque application. Le GT recommande que la séquence utilisée pour la recherche de similarité soit définie en taille et en localisation selon le mécanisme de la technique mise en œuvre pour le ciblage de la modification.

De la même façon, le GT « Biotechnologie » considère que la région dans laquelle des modifications seront recherchées devra être adaptée à la fois au type de modification intentionnelle effectuée au site concerné, et au type de modifications recherchées.

Ainsi, dans le cas d'une technique utilisant CRISPR-Cas9, le site utilisé pour la recherche de similarité pourrait ne désigner que la région de reconnaissance de l'ARN guide (dont la longueur est d'environ 20 nucléotides) ou un petit intervalle incluant cette région. L'ensemble du gène ciblé pourrait être considéré pour la recherche de modifications génétiques non intentionnelles. Cette alternative permettrait de détecter des délétions susceptibles de se produire dans le gène ciblé mais hors du site ciblé par la modification, comme rapportées par la revue de Sturme et collègues (2022).

Dans le cas d'une cisgenèse, le GT estime que le site utilisé pour la recherche de similarité pourrait désigner un intervalle donné autour du site d'insertion selon la technique de ciblage utilisée, et la séquence utilisée pour la recherche de modifications génétiques pourrait couvrir un intervalle plus large, incluant la séquence cisgénique insérée ; en cas de large délétion par

l'intermédiaire de cassures d'ADN au niveau de sites flanquant l'intervalle à éliminer, ces deux sites devront être considérés conjointement pour la recherche de similarité, et de plus larges régions adjacentes pour la recherche de modifications associées, etc.

Le GT recommande donc qu'une définition du « site ciblé » soit précisée de telle façon que la déclinaison des critères qui en découle reste pertinente. En l'absence d'une telle définition, le GT alerte sur un risque de distorsions entre les dossiers, lié à l'interprétation de chaque demandeur.

- Identification de séquences similaires :

La détermination des « séquence[s] d'ADN partageant une similarité de séquence avec le site ciblé » dépendra non seulement de la séquence prise en référence au « site ciblé », mais également d'un seuil de similarité (ou un pourcentage d'identité donné), des données génomiques disponibles dans l'espèce considérée, du logiciel et des paramètres utilisés.

- Seuil maximal de 20 modifications génétiques :

Le document technique des services de la Commission européenne (EC, 2023) justifie ce seuil par l'objectif d'exclure les plantes NTG avec des modifications complexes dont il serait peu probable qu'elles puissent être obtenues par des techniques d'obtention conventionnelles. Dans ce document, l'exemple de l'obtention d'une lignée de blé avec un taux de gluten réduit illustre la capacité de CRISPR-Cas9 de modifier simultanément jusqu'à 35 des 45 gènes codant la protéine alpha-gliadine présents chez le blé (Sánchez-León *et al.*, 2018). Ce résultat ne pouvant être atteint par des techniques conventionnelles, la plante NTG ainsi modifiée ne peut être considérée comme équivalente à une plante conventionnelle.

Si l'objectif recherché par un tel seuil est clair, le GT considère que le nombre de 20 choisi comme seuil maximal de modifications génétiques acceptées pour qu'une plante NTG soit considérée équivalente à une plante conventionnelle n'est pas justifié. Le document technique s'appuie sur l'identification d'un nombre de 30 à 100 mutations générées par mutagenèse aléatoire par plante. Le GT considère que cette comparaison semble peu pertinente considérant que le nombre de ces mutations varie selon l'intensité du traitement mutagène et que les mutations non désirées sont ensuite éliminées par l'obteneur par ségrégation génétique, ce qu'il ne ferait pas nécessairement suite à une mutagenèse ciblée.

Par ailleurs, sur une telle base d'équivalence numérique, il serait attendu que la définition d'un seuil de modifications génétiques par génome dépende de la taille du génome et ne soit donc pas fixée dans l'absolu. Si un parallèle est fait avec le nombre de mutations générées par mutagenèse aléatoire, il est attendu qu'à densité équivalente de mutations dans le génome, un nombre plus grand soit généré dans un génome plus grand.

Pour ce qui est de la considération de la ploïdie, le GT note que chez les polyploïdes, un nombre supérieur de modifications devra être réalisé pour obtenir un phénotype donné du fait de la redondance fonctionnelle des gènes homéologues. Par exemple, chez le blé hexaploïde, la modification ciblée des trois allèles homéologues du gène *MLO* a été nécessaire pour obtenir une résistance à l'oïdium des céréales (Wang *et al.*, 2014). Ainsi, pour un seuil de modifications génétiques donné, les plantes à basse ploïdie seront favorisées en ce qu'elles auront la possibilité d'accumuler davantage de modifications génétiques uniques.

Par ailleurs, la probabilité d'obtenir des mutations similaires sur différents homéologues par des techniques d'obtention conventionnelles étant infime, il semble cohérent que ces plantes atteignent moins facilement le statut de catégorie 1 du fait de la complexité des modifications effectuées par NTG.

D'un autre côté, s'il est avéré que ces mutations existent dans le pool génétique des obtenteurs, l'obtention d'une telle lignée par des techniques conventionnelles ne serait pas impossible mais juste extrêmement laborieuse du fait du grand nombre de croisements qu'elle nécessiterait. Dans ce cas particulier où la mutagenèse ciblée faciliterait et accélérerait l'obtention d'une combinaison de modifications qui pourraient également être obtenues par des techniques conventionnelles, l'équivalence serait justifiée.

Cette réflexion montre qu'un seuil numérique n'est pas toujours le critère le plus pertinent pour décider de l'équivalence d'une plante NTG à une plante conventionnelle.

Le GT « Biotechnologie » souligne que cette remarque est valable pour la situation opposée où certaines modifications ont en elles-mêmes une très faible probabilité d'être produites par des techniques d'obtention conventionnelles. Ainsi, lorsque l'obtention du phénotype recherché n'est possible que par une seule modification de la séquence d'un gène et que cette modification n'est pas présente dans le pool génétique de l'obtenteur, la probabilité de l'obtenir par sélection conventionnelle ou de l'identifier dans des populations naturelles devient très faible. Le GT indique pour exemple que l'obtention d'une variété de tomate à teneur augmentée en GABA a nécessité d'introduire un codon « stop » à un endroit précis de la séquence du gène *SIGAD3* pour provoquer la suppression de l'expression de la région C-terminale régulatrice (Nonaka *et al.*, 2017). Les auteurs rapportent que dans une précédente étude portant sur 4 588 lignées mutagénisées, les deux mutations identifiées par TILLING au gène *SIGAD3* n'étaient pas localisées dans une position qui aurait pu affecter l'expression de la région C-terminale. Pour le GT, cet exemple illustre que la faible probabilité d'obtenir une plante par des techniques d'obtention conventionnelles n'est pas nécessairement liée à la combinaison d'un grand nombre de modifications.

Le GT « Biotechnologie » note enfin qu'il est probable qu'une vision comptable des modifications génétiques risque d'entraîner des difficultés pratiques de décompte, pour le demandeur comme pour les autorités en charge de l'étude de la demande, certaines modifications pouvant être considérées ou non comme la somme de différentes modifications de différents types de l'annexe I.

- Modifications génétiques « hors cible » dans des séquences similaires à la cible :

Le GT souligne que ces conditions générales impliquent que les modifications génétiques non intentionnelles générées par manque de spécificité dans des sites possédant un certain degré d'homologie avec la cible seront comptabilisées parmi les 20 modifications génétiques acceptées, sans être considérées en termes de potentiels effets négatifs. Le document technique, qui fonde son raisonnement d'équivalence sur une simple analyse moléculaire d'occurrence de certains types de modifications génétiques, n'aborde pas la question des risques.

Le GT note que le nombre de ces modifications génétiques non intentionnelles diminue avec l'augmentation de la spécificité des techniques de ciblage des NTG, et qu'il se situe largement en deçà de celui des modifications générées par certaines techniques considérées comme conventionnelles dans la proposition de règlement, comme la mutagenèse aléatoire (Sturme

et al., 2022). Il convient cependant de rappeler que ces dernières sont éliminées en grande partie par ségrégation génétique dans les étapes de sélection suivant une mutagenèse aléatoire, ce qui n'est pas nécessairement le cas pour les NTG.

Le GT « Biotechnologie » recommande que ces modifications non intentionnelles soient éliminées autant que possible des plantes NTG, et en cas d'impossibilité ou de difficulté (par ex. pour les plantes à reproduction végétative ou à long cycle de génération), d'en évaluer les risques potentiels et de ne les tolérer que si ces risques sont considérés négligeables.

- Modifications génétiques dans le reste du génome :

Le GT « Biotechnologie » souligne que ces conditions générales, focalisées sur un nombre maximal de modifications génétiques acceptables au site ciblé et dans des séquences similaires, semblent ignorer, et non exclure, les possibles modifications qui se produiraient dans le reste du génome. Toute modification est-elle donc tolérée hors de la cible et des séquences similaires (à part la présence d'éléments transgéniques, exclus de par la définition du végétal NTG) ?

Par exemple, dans le cas d'une cisgenèse/intragenèse non ciblée, aucun des critères proposés ne s'appliquerait du fait de l'absence de cible, et la formulation actuelle de ce critère induirait que la modification serait tolérée sans même être décomptée. Telle que rédigée, si l'annexe I ne concerne pas les modifications hors des cibles et de leurs séquences similaires, elle ne les exclut pas explicitement.

Par ailleurs, cela est également vrai pour toute modification non intentionnelle qui se produirait hors du site et des sites similaires, comme des insertions/délétions, des décalages de cadre de lecture ou tout type de variations structurales, qui pourraient notamment se produire au site temporaire d'insertion des effecteurs de NTG : hors éléments transgéniques, elles seraient tolérées sans conditions ni décompte.

Le GT « Biotechnologie » demande qu'une clarification explicite soit faite concernant la considération des modifications génétiques, hors éléments transgéniques, qui pourraient être générées dans le reste du génome.

3.2.2.2. Critère 1

1) *substitution ou insertion de 20 nucléotides au maximum ;*

■ Clarification

Ce point indique que des substitutions et insertions sont acceptées dans la limite d'un seuil maximal fixé à 20 nucléotides pour la taille de l'insert (au site ciblé et dans des séquences similaires, selon les conditions générales).

Le document technique clarifie qu'une substitution est considérée comme une combinaison d'une délétion et d'une insertion. Conformément au critère 2 applicable aux délétions, aucune condition ne s'applique à la séquence substituée.

■ Techniques concernées

Ce critère 1 concerne *a priori* des modifications générées intentionnellement par les techniques de mutagenèse ciblée. Le document technique indique que « les insertions plus larges de type réarrangements structuraux devraient être considérées comme des insertions de cisgènes, qui sont couvertes par le critère 3 ».

Par ailleurs, il est spécifié que les séquences cisgéniques obtenues par toute autre modification ciblée de toute taille peuvent tolérer des modifications de type 1 (voir critère 5).

Enfin, il est envisageable que ce critère s'applique pour comptabiliser d'éventuelles modifications non intentionnelles consistant en de petites insertions hors du pool génétique des obtenteurs, qu'elles soient générées lors d'une mutagenèse ciblée ou lors de la cisgenèse par insertion/substitution couverte par le critère 3.

■ Commentaires

- Seuil maximal de 20 nucléotides :

Si le seuil de 20 nucléotides proposé ne dépasse pas les observations rapportées dans la littérature scientifique pour la taille des modifications génétiques résultant de l'application de techniques d'obtention conventionnelles (plus fréquemment observées sous les 10 nucléotides mais pouvant aller jusqu'à 50 nucléotides pour les insertions de petite taille, selon le document technique), le GT « Biotechnologie » souligne que la seule taille de la modification ne renseigne en rien sur ses conséquences fonctionnelles. Cette limite de substitution ou insertion fixée à 20 nucléotides maximum n'a pas de signification ou justification biologique.

En effet, positionnée dans un exon, une modification d'un nombre de bases multiple de 3 pourra modifier la séquence en acides aminés de la protéine codée tandis que d'autres tailles (non multiples de 3 quelles qu'elles soient) induiront un décalage du cadre de lecture et un codon « stop », pouvant résulter soit en une absence d'expression du gène soit en une protéine tronquée. Dans une région promotrice, la modification peut supprimer ou modifier l'expression d'un gène. Dans un gène régulateur, ou facteur de transcription, ce sont les expressions d'un grand nombre de gènes d'une même voie de régulation qui peuvent être modifiées, etc.

Le GT « Biotechnologie » souligne que les modifications génétiques observées dans les variétés obtenues par techniques conventionnelles sont le résultat d'une sélection par les obtenteurs, postérieure à l'application d'un éventuel traitement mutagène. Les éventuelles modifications indésirables sont éliminées par ségrégation génétique au profit des modifications recherchées, la plupart du temps par sélection phénotypique et non sur la taille moléculaire de la modification. Rien n'indique que les modifications indésirables éliminées se distinguent des modifications retenues par leur taille.

Par ailleurs, le document technique rappelle que la taille de 20 nucléotides correspond à la taille limite en deçà de laquelle il devient très peu probable qu'une séquence aléatoire soit présente de manière unique dans un génome (Broothaerts *et al.*, 2021). Le GT « Biotechnologie » estime que cette limite devrait varier selon la taille du génome, et être d'autant plus élevée que les génomes sont de grande taille et/ou polypléides.

Il découle de cette estimation statistique qu'une séquence de taille inférieure à 20 nucléotides aura une très forte probabilité d'être déjà présente naturellement dans le génome. Le GT « Biotechnologie » note cependant que ces séquences qui préexistent dans le génome peuvent, selon leur localisation génomique, être de nature fonctionnelle différente d'une séquence identique intentionnellement introduite à une autre localisation dans un objectif fonctionnel précis.

Les séquences codantes ne représentent qu'une faible proportion du génome. Par exemple, chez le maïs, les gènes annotés représentent environ 8 % du génome (Hufford *et al.*, 2021). Il est donc possible que les séquences identiques qui préexisteraient dans le génome n'aient aucun rôle biologique/fonctionnel, à la différence de la séquence substituée ou insérée intentionnellement dans une cible donnée ou non intentionnellement dans une séquence similaire. Il convient également de noter que certains motifs de fixation de facteurs de transcription ou d'initiation de transcription, pouvant activer ou réprimer l'expression d'un gène, font moins de 20 nucléotides.

Le GT « Biotechnologie » conclut qu'il n'y a pas de justification scientifique pour accepter (au sens de l'équivalence) des substitutions ou insertions sur la base de leur taille. De plus, le seuil maximal de 20 nucléotides pour une insertion ou substitution n'a pas été prouvé particulièrement pertinent pour la définition d'une équivalence à des plantes conventionnelles.

3.2.2.3. Critère 2

2) délétion de tout nombre de nucléotides ;

■ Clarification

Ce point indique que toute délétion est acceptée sans conditions (au site ciblé et dans des séquences similaires, selon les conditions générales).

■ Techniques concernées

Le critère 2 concerne *a priori* des modifications générées par les techniques de mutagenèse ciblées. Par ailleurs, il est spécifié que les séquences cisgéniques obtenues par toute autre modification ciblée de toute taille, peuvent tolérer des modifications de type 2 (voir critère 5). Enfin, il est envisageable que ce critère s'applique pour comptabiliser d'éventuelles modifications non intentionnelles générées lors de la mise en œuvre de mutagenèse ciblée ou de cisgenèse.

■ Commentaires

Le GT « Biotechnologie » estime que ce critère de délétion sans conditions ne semble pas justifié au regard de la littérature sur les analyses de pan-génomiques, qui montrent que la distribution de taille des variations structurales est fortement biaisée en faveur des tailles de l'ordre du kilobase ou inférieures au kilobase. Les grandes variations existent mais sont beaucoup plus rares et plutôt de type translocation, inversion ou duplication.

Le GT considère que, du point de vue des conséquences fonctionnelles, la délétion d'un gène entier serait identique à la variation de présence-absence des gènes, qui est largement observée dans les variétés obtenues de manière conventionnelle.

Le GT souligne toutefois que même pour ces tailles limitées, les délétions retenues dans ces variétés ont passé les étapes de sélection par l'obteneur. La variation de présence-absence des gènes non essentiels hors des pan-génomés est le résultat de la sélection naturelle. La seule taille ne serait donc pas nécessairement garante d'une équivalence entre des délétions nouvellement générées dans des plantes NTG et des délétions de plantes obtenues par techniques conventionnelles.

Enfin, les délétions de grandes tailles qui provoqueraient la suppression simultanée d'un grand nombre de gènes liés sont par contre rarement observées dans les variétés obtenues par des techniques conventionnelles.

Le GT « Biotechnologie » conclut que les délétions de type variations structurales observées chez les plantes conventionnelles sont plus souvent limitées à des délétions de l'ordre du kilobase. Quelle que soit leur taille, les conséquences fonctionnelles de ces délétions devraient être caractérisées.

3.2.2.4. Critère 3

3) à condition que la modification génétique n'interrompe pas un gène endogène :

- a) insertion ciblée d'une séquence d'ADN contiguë existant dans le pool génétique de l'obteneur ;
- b) substitution ciblée d'une séquence d'ADN contiguë existant dans le pool génétique de l'obteneur à une séquence d'ADN endogène ;

■ Clarification

Le GT « Biotechnologie » s'est interrogé sur le sens de l'expression « séquence d'ADN contiguë ». Deux objets, comme deux nucléotides, peuvent être contigus, mais un objet ne peut être contigu seul. Au vu du document technique et du dernier avis de l'Efsa sur la cisgénèse (EFSA GMO Panel, 2022), il semblerait que l'expression recherchée soit plutôt « séquence d'ADN continue » (l'Efsa utilise dans son avis l'expression « *a single intact and continuous sequence* »), qui distingue une séquence cisgénique au sens strict du terme d'une séquence composite et réarrangée, caractéristique de l'intragenèse.

La condition précisant que la modification ne doit pas interrompre de gène endogène doit s'accompagner d'une clarification de ce qui est entendu par « gène ». Il pourrait s'agir de la séquence codante ou de l'ensemble des introns et des exons, des régions 5' et 3' non traduites, du promoteur et du terminateur, voire des éléments régulateurs d'expression possiblement situés à des kilobases en amont ou en aval de la séquence codante.

Selon le document technique, ce critère devrait exclure toute intragenèse, ce qui indiquerait que l'insertion de la séquence d'ADN considérée hors d'un gène endogène devrait être suffisamment éloignée de tout élément génétique appartenant à un gène pour éviter que la séquence résultante puisse être considérée comme un réarrangement de séquence.

De même, selon le même argument visant à éviter un résultat intragénique, la « *substitution ciblée d'une séquence d'ADN contiguë existant dans le pool génétique de l'obteneur à une séquence d'ADN endogène* », « *à condition qu'elle n'interrompe pas de gène endogène* » pourrait être interprétée comme devant être suffisamment large pour englober la totalité d'une séquence endogène. Cette séquence pourrait éventuellement être constituée d'un gène dans toutes ses composantes, et comme pour l'insertion, suffisamment éloignée de tout élément génétique appartenant à d'éventuels gènes voisins.

■ Techniques concernées

Les techniques concernées sont celles capables de cisgenèse ciblée par insertion ou substitution.

■ Commentaires

- Quelle cible ?

L'insertion de la séquence d'ADN continue est supposée être ciblée hors d'un gène endogène, sans qu'aucune condition supplémentaire ne soit exigée de la cible. Cela soulève la question de cohérence de traitement suivante : quelle différence y a-t-il entre une insertion ciblée dans un site n'interrompant pas de gène endogène, sans condition supplémentaire requise sur le site ciblé, et une insertion par des techniques de transformation non ciblées, dont on aurait vérifié après traitement qu'elle n'interrompt pas de gène endogène ? Selon le critère proposé, seul le premier cas pourrait déroger à l'application des exigences de la législation OGM au titre de la catégorie 1 alors que les deux produits pourraient être considérés comme équivalents en ce qu'ils n'interrompent pas de gène endogène.

Certaines techniques NTG pourraient permettre de définir la cible de la cisgenèse de telle sorte que la séquence cisgénique soit insérée au site du gène ou de la séquence orthologue, possiblement en substituant l'allèle d'origine par le nouvel allèle le cas échéant, résultant en une équivalence plus claire à une plante conventionnelle dans laquelle ce même allèle aurait été introgressé par croisement.

Aucune précision n'est donnée sur une éventuelle relation d'orthologie entre la séquence substituée et la nouvelle séquence.

Le GT « Biotechnologie » estime qu'un ciblage de la séquence cisgénique au site de la séquence orthologue permettrait d'éviter les éventuels effets de position associés à un nouveau site d'insertion, caractéristiques des techniques de transformation génétique classiques.

- Exclusion de l'intragenèse :

Le GT « Biotechnologie » note que ce critère ne s'applique qu'à la seule cisgenèse au sens strict du terme (hors intragenèse). Le document technique précise que, par ce critère, l'intragenèse est exclue de l'ensemble des critères, ce qui mériterait une clarification plus explicite dans l'annexe I.

Le GT « Biotechnologie » considère que l'exclusion des plantes obtenues par intragenèse de la catégorie 1 des plantes NTG est justifiée. En effet, les réarrangements entre différentes séquences du pool génétique de l'obteneur caractéristiques des séquences intragéniques ne pourraient apparaître naturellement ou être obtenues par des techniques conventionnelles.

3.2.2.5. Critère 4

4) *inversion ciblée d'une séquence de tout nombre de nucléotides ;*

■ Clarification

Ce point indique que toute inversion est acceptée sans conditions de taille (au site ciblé et dans des séquences similaires, selon les conditions générales).

L'utilisation du terme « ciblée » doit être explicitée dans ce critère, considérant les conditions générales applicables à chacun des types de modification listés.

■ Techniques concernées

Ce critère concernerait *a priori* des modifications non intentionnelles générées au site ciblé et dans des séquences similaires par des techniques de mutagenèse ciblée ou cisgenèse ciblée.

■ Commentaires

Comme pour le critère de délétion sans conditions, ce critère d'inversion sans conditions de taille ne semble pas justifié au regard de la littérature sur les analyses de pan-génomiques (cf critère 2).

Par ailleurs, la détection de ce type d'événement exigerait des techniques d'analyse adaptées.

3.2.2.6. Critère 5

5) *toute autre modification ciblée de toute taille, à condition que les séquences d'ADN qui en résultent soient déjà présentes [éventuellement avec les modifications acceptées conformément aux points (1) et/ou (2)] dans une espèce du pool génétique des obtenteurs.*

■ Clarification

Selon le document technique, ce critère viserait à « considérer tout ce qui pourrait se passer au niveau des séquences d'ADN d'une espèce du pool génétique des obtenteurs qui n'aurait pas été couvert par les précédents critères ». Il est également précisé que « ce critère apporte une dérogation au seul critère 3 et à la condition que la modification génétique n'interrompe pas de gène endogène ».

Le GT « Biotechnologie » estime que ce critère manque de clarté. Il pourrait s'agir d'une autre forme de cisgenèse ciblée réalisée, en complément au critère 3, possiblement au sein d'un gène endogène, par toute modification ciblée d'un autre type que celles mentionnées précédemment, qui pourrait donc inclure une mutagenèse ciblée sans conditions de taille, à condition que la séquence résultante existe dans le pool génétique des obtenteurs, éventuellement modifiée par des délétions ainsi que des substitutions ou insertions de séquences de moins de 20 nucléotides. Ce critère devrait donc être clarifié et des exemples donnés en illustration.

■ Techniques concernées

Il s'agirait vraisemblablement de techniques de mutagenèse ciblée (de type SDN-2, ODM, *base editing* ou *prime editing*), ou d'insertion/substitution ciblée (de type *prime editing* ou SDN-3) qui résulterait en une séquence cisgénique.

■ Commentaires

L'objectif de satisfaire une exigence d'exhaustivité, affiché dans le document technique, n'est pas étonnant vu le manque de spécificité du critère. Les conditions limitantes énoncées aux critères précédents ne sont plus valables, toute modification semble permise du moment que la séquence résultante est une séquence cisgénique au site ciblé, séquence autorisée à varier dans les limites définies aux critères 1 et 2 (toute délétion et la possibilité de substitutions ou insertions de séquences de moins de 20 nucléotides).

Il semble incohérent d'autoriser des variations de cette séquence cisgénique alors qu'elles ne semblaient pas tolérées au critère 3.

En revanche, le fait d'autoriser tout type de modification du moment que la séquence résultante est une séquence cisgénique est cohérent avec la démarche d'équivalence focalisée sur la nature moléculaire du produit obtenu. Les techniques mises en œuvre resteront toutefois limitées aux techniques de mutagenèse ciblée et cisgenèse définies pour le végétal NTG.

Le fait que le pluriel soit utilisé dans la formulation du critère (« à condition que les séquences d'ADN qui en résultent soient déjà présentes dans une espèce du pool génétique ») introduit un doute sur la possibilité qu'il puisse s'agir de fragments de séquences réarrangés résultant collectivement en une séquence intragénique.

Le GT « Biotechnologie » estime qu'un critère conduisant des plantes intragéniques à être exemptées des exigences de la législation OGM ne serait pas justifiable.

3.2.3. Autres commentaires généraux

3.2.3.1. Points à clarifier

Le GT « Biotechnologie » considère que, dans son ensemble, l'annexe I manque de clarté.

Le GT souligne que :

- certains termes ne sont pas définis dans la proposition de règlement et demandent à être clarifiés (végétaux conventionnels, site ciblé, similarité, gène, séquence d'ADN contiguë) ;
- *a contrario*, certains termes définis dans la proposition de règlement ne sont pas utilisés dans l'annexe I alors qu'ils seraient éclairants, comme mutagenèse, cisgenèse et intragenèse ;
- les termes à la fois définis dans la proposition de règlement et utilisés dans l'annexe I prêtent à confusion, comme « végétaux NTG », qui désignent un sous-ensemble des végétaux obtenus par NTG.

Le GT « Biotechnologie » estime que certaines précisions fournies dans le document technique mériteraient d'être incluses dans l'annexe I, comme – si c'est effectivement le cas – l'exclusion de l'intragenèse ou de la cisgenèse non ciblée des techniques acceptables dans les plantes de catégorie I.

3.2.3.2. Questions en termes de fondement scientifique

Le document technique de la Commission affirme que « des modifications génétiques similaires obtenues par différentes techniques ne sont pas supposées présenter différents risques », et « si certains types et nombres de mutations peuvent être introduits par des techniques d'obtention conventionnelles autant que par des NTGs, alors le type de caractères associés à ces mutations ne différeront pas entre ces techniques ». Il en conclut qu'il est suffisant de ne considérer que le type et le nombre de mutations pour évaluer l'équivalence entre ces plantes, et qu'il n'est pas nécessaire de considérer les effets associés.

Le GT « Biotechnologie » considère qu'il n'y a pas de fondement scientifique sous-tendant une équivalence de type de caractères ou de niveau de risques entre deux catégories de plantes sur la base d'un contenu équivalent en variations ou modifications génétiques qui seraient uniquement définies par leur type, leur taille et leur nombre.

Le GT rappelle que la variabilité génétique ou les variations génétiques observables dans la nature sont le produit de milliers d'années d'évolution, de dérive ou de sélection naturelle. Les variations ou modifications génétiques observées dans les variétés produites par des techniques d'obtention conventionnelles ont passé le crible de la sélection par les obtenteurs. Dans les deux cas, les variations ou modifications génétiques associées à des effets délétères sont éliminées, que ce soit par rapport à la *fitness* de la plante ou à sa valeur sélective dans la nature, ou par rapport aux caractéristiques agronomiques et qualitatives recherchées par l'Homme dans les programmes de sélection conventionnelle. L'élimination ou la sélection de ces variations et modifications ne se fait pas par rapport à leur type, leur taille ou leur nombre, mais par rapport à leurs éventuelles conséquences sur une fonction biologique.

Le GT « Biotechnologie » souligne que les conséquences fonctionnelles ou biologiques d'une variation ou modification génétique donnée ne sont pas déterminées par son type ou sa taille.

Si l'on analyse néanmoins la démarche d'équivalence proposée, qui se concentre donc sur les types, les tailles et le nombre de modifications génétiques, **le GT « Biotechnologie » estime que les seuils à ne pas dépasser, fixés à un nombre de 20 modifications génétiques par plante, au site ciblé et aux séquences similaires, et à une taille de 20 nucléotides pour les insertions et les substitutions, ne sont pas justifiés. Pas plus que l'acceptation de toute délétion et de toute inversion sans conditions, ou, dans une moindre mesure, d'une cisgenèse ciblée sans conditions d'orthologie sur la cible.**

L'absence de considération des modifications potentielles hors des sites ciblés et des séquences similaires (à l'exception des éléments transgéniques, de par la définition du végétal NTG) n'est pas justifiée non plus.

3.3. Conclusions du Groupe de travail « Biotechnologie »

Le GT « Biotechnologie » rappelle le contexte de cette autosaisine :

La proposition de règlement relative aux NTG adoptée le 5 juillet 2023 par la Commission européenne propose de soustraire de la législation OGM certaines plantes génétiquement modifiées par des NTG au motif qu'elles seraient équivalentes à des plantes conventionnelles.

Pour ce faire, elle propose des critères d'équivalence qui permettraient d'assurer que les plantes NTG qui les respecteraient (plantes NTG de catégorie 1) auraient pu être produites au moyen de techniques d'obtention conventionnelles.

Le GT « Biotechnologie » rappelle la question clef de l'autosaisine : dans quelle mesure les plantes ainsi définies peuvent-elles être effectivement considérées comme équivalentes à des plantes obtenues par des techniques conventionnelles ?

Pour y répondre, le GT « Biotechnologie » s'est d'abord attaché à clarifier les critères d'équivalence proposés, explicitant les termes et notions nécessaires pour les comprendre et délimitant les différents ensembles de techniques concernées, capables de générer les modifications génétiques considérées. Il a ensuite approfondi son analyse scientifique, critère par critère, et soulevé un certain nombre de questions, mettant en évidence les limites associées et examinant plus largement leur fondement scientifique.

A l'issue de ses travaux, le GT « Biotechnologie » retient les points suivants :

1) Manque de clarté :

- Les critères d'équivalence manquent singulièrement de clarté, notamment par l'utilisation de termes non univoques (site ciblé, similarité, gène, pool génétique des obtenteurs, séquence d'ADN contiguë) ;
- Les critères se focalisent uniquement sur des modifications génétiques localisées dans un « site ciblé » et des séquences similaires. Le « site ciblé » et les séquences similaires sont à définir ; leur définition conditionnera les modifications génétiques considérées ;
- L'exclusion de plantes intragéniques des plantes NTG de catégorie 1 n'est pas explicitement indiquée dans les critères et devrait être clarifiée ;
- L'exclusion de plantes obtenues par cisgenèse non ciblée des plantes NTG de catégorie 1 n'est pas explicitement indiquée dans les critères et devrait être clarifiée.

2) Insuffisance de justifications scientifiques de l'équivalence recherchée entre des plantes NTG respectant les critères proposés et des plantes conventionnelles :

- Le seuil maximal de modifications génétiques acceptables proposé est insuffisamment justifié ;
- La possibilité ou la probabilité qu'une modification ou une combinaison de modifications donnée soit obtenue par des techniques conventionnelles devrait être considérée ;
- Sur la base de l'analyse des pan-génomes, l'acceptation de délétions et inversions sans conditions de taille n'est pas scientifiquement justifiée ;
- L'absence de considération des modifications génétiques non intentionnelles potentiellement localisées hors des sites ciblés et des séquences similaires (à part les éléments transgéniques) n'est pas justifiée.

- 3) La non prise en compte de la relation des critères d'équivalence proposés au risque :
- Le document technique indique que des catégories de plantes qui seraient équivalentes en type, taille et nombre de variations ou modifications génétiques seraient équivalentes en type de caractères et niveau de risques. Ce postulat n'a pas de justification scientifique ;
 - La proposition d'un seuil maximal de modifications génétiques acceptables n'est pas scientifiquement fondée en termes de risques : le risque associé n'est pas directement proportionnel à un nombre de modifications quelles qu'elles soient ;
 - La proposition d'un seuil maximal pour la taille des insertions ou substitutions acceptées n'a pas de sens biologique ; les conséquences fonctionnelles et les risques potentiellement associés à une insertion ne sont pas proportionnels à la longueur de sa séquence nucléotidique ;
 - L'acceptation de toute délétion ou inversion sans considérer les conséquences fonctionnelles et les risques potentiellement associés n'est pas justifiée ;
 - Le fait que les modifications génétiques non intentionnelles, générées par manque de spécificité dans les séquences similaires à la cible, soient comptabilisées dans le décompte des modifications génétiques proposé sans que leurs possibles effets négatifs ne soient considérés n'est pas justifié.

Ainsi, l'analyse des critères proposés visant une équivalence entre plantes NTG et plantes conventionnelles a conduit le GT « Biotechnologie » à considérer la problématique de façon plus globale. Le GT propose que ces critères d'équivalence, basés uniquement sur les aspects moléculaires, qui de plus sont insuffisamment justifiés, prennent en compte les caractères des plantes et leurs éventuels risques.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) rappelle qu'elle a engagé, sur saisine des ministères chargés de l'environnement et de l'agriculture et alors que la proposition de règlement n'était pas encore parue, une expertise sur les méthodes d'évaluation des risques des plantes NTG et leur impact socio-économique, qui devrait être disponible au premier trimestre 2024. Cette expertise en cours s'attache notamment à identifier les adaptations à apporter à la méthodologie l'évaluation des risques (sanitaires et environnementaux) des plantes issues de transgénèse lorsque l'évaluation va porter sur des plantes issues de mutagenèse dirigée réalisée à l'aide de CRISPR-Cas9 et techniques dérivées.

Suite à la publication de la proposition de règlement, l'Anses a décidé de s'autosaisir afin de mener une analyse des critères définissant les plantes NTG de catégorie 1, considérée comme équivalente aux plantes conventionnelles, exposés dans l'annexe 1 et justifiés par une note technique diffusée par la Commission européenne en octobre. Cette analyse est l'objet du présent avis.

Les conclusions du GT « Biotechnologies » sont de trois ordres : des besoins de clarification de définitions ou de champ d'application, la question de la justification scientifique des critères, et enfin la prise en compte des risques potentiels dans les critères d'équivalence.

S'agissant tout d'abord de la non prise en compte, dans les critères d'équivalence, des conséquences fonctionnelles ou des risques potentiels, l'Agence partage le constat des experts du GT. Elle souligne cependant que cette situation prévaut d'ores et déjà dans l'encadrement des OGM par le dispositif législatif issu de la directive 2001/18/CE. En effet, le fait que seules les plantes issues de transgénèse soient redevables d'un dossier démontrant la maîtrise ou l'absence de risques, et qu'en soient exemptées les plantes issues des techniques conventionnelles incluant la mutagénèse aléatoire, relève du débat et de choix faits au moment de la mise en place de l'encadrement des OGM, une partie de l'argumentaire résidant dans le caractère conventionnel des techniques et leur antériorité d'usage. L'Anses note que le dispositif des critères d'équivalence prolonge de fait, pour les NTG, la ligne de partage entre les plantes soumises et non soumises à évaluation, selon la logique des textes actuels.

Un corollaire de cette construction réglementaire est que les termes et les définitions doivent être particulièrement clairs et univoques. Aussi, l'Anses endosse et soutient les demandes de clarification des experts. Si certains des manques de précision peuvent résulter de la diversité des textes qui ont servi de base au projet de règlement (rapport du JRC, avis de l'EFSA, ...), il importe que le texte final soit autoportant. Un premier manque majeur est l'absence de définition des végétaux conventionnels avec lesquels la règle de décision doit établir la comparaison. D'autres clarifications importantes sont recommandées, dont : le fait d'explicitier l'exclusion de la cisgénèse non ciblée dans les techniques NTG couvertes, de distinguer plus précisément l'intragénèse de la cisgénèse, de préciser les matériels inclus dans les insertions (les travaux du JRC et de l'EFSA mobilisés pour établir le projet de règlement sont plus précis que le terme « matériel génétique » utilisés dans ce même projet), la définition des sites ciblés par les opérations de NTG, l'application du critère 3 à la seule cisgénèse au sens strict (hors intragénèse), et enfin des clarifications sur le « pool génétique des obtenteurs ».

Enfin, l'Anses endosse les conclusions du GT « Biotechnologie » relatives à différentes limites dans les justifications scientifiques des critères d'équivalence. L'Agence souligne notamment que la piste de remplacer certains seuils en valeur absolue par des seuils dépendant de la longueur des génomes des plantes serait à considérer.

Pr. Benoît VALLET

MOTS-CLES

OGM, nouvelles techniques génomiques, NTG, techniques d'obtention conventionnelles, mutagenèse ciblée, mutagenèse dirigée, cisgenèse, législation, réglementation, Union européenne

GMO, new genomic techniques, NGT, conventional breeding techniques, targeted mutagenesis, cisgenesis, legislation, regulation, European Union

BIBLIOGRAPHIE

Anzalone, Andrew V., Xin D. Gao, Christopher J. Podracky, Andrew T. Nelson, Luke W. Koblan, Aditya Raguram, Jonathan M. Levy, Jaron A. M. Mercer, et David R. Liu. « Programmable Deletion, Replacement, Integration and Inversion of Large DNA Sequences with Twin Prime Editing ». *Nature Biotechnology* 40, n° 5 (mai 2022): 731-40. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01133-w>.

Broothaerts W, Jacchia S, Angers A, Petrillo M, Querci M, Savini C, Van Den Eede G, et Emons H. « New Genomic Techniques: State-of-the-Art Review », n° KJ-NA-30430-EN-N (online) (2021). <https://doi.org/10.2760/710056> (online).

Charlesworth, Deborah, et Brian Charlesworth. « Evolutionary Biology: The Origins of Two Sexes ». *Current Biology: CB* 20, n° 12 (22 juin 2010): R519-521. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.05.015>.

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 – Déclaration de la Commission. JO L 106 du 17 avril 2001, pp. 1-39.

European Commission services, Regulation on new genomic techniques (NGT) – Technical paper on the rationale for the equivalence criteria in Annex I, 16 Oct. 2023.

EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms), 2012. Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA Journal* 2012;10(2):2561. [33 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2561. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal.

EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms), Mullins E, Bresson J-L, Dalmay T, Dewhurst IC, Epstein MM, Firbank LG, Guerche P, Hejatko J, Moreno FJ, Naegeli H, Nogu_e F, S_anchez Serrano JJ, Savoini G, Veromann E, Veronesi F, Casacuberta J, Fernandez Dumont A, Gennaro A, Lenzi, P, Lewandowska A, Munoz Guajardo IP, Papadopoulou N and Rostoks N, 2022. Updated scientific opinion on plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA Journal* 2022;20(10):7621, 33 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7621>

Gill, Rafaqat A., Federico Scossa, Graham J. King, Agnieszka A. Golicz, Chaobo Tong, Rod J. Snowdon, Alisdair R. Fernie, et Shengyi Liu. « On the Role of Transposable Elements in the

Regulation of Gene Expression and Subgenomic Interactions in Crop Genomes ». *Critical Reviews in Plant Sciences* 40, n° 2 (4 mars 2021): 157-89. <https://doi.org/10.1080/07352689.2021.1920731>.

HCB (Haut Conseil des biotechnologies). « 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. (2020) (Paris, HCB), 44 p. Disponible sur <http://www.hautconseildesbiotechnologies.fr>.

He, Yubing, Michael Mudgett, et Yunde Zhao. « Advances in Gene Editing without Residual Transgenes in Plants ». *Plant Physiology* 188, n° 4 (28 mars 2022): 1757-68. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab574>.

Hufford, Matthew B., Arun S. Seetharam, Margaret R. Woodhouse, Kapeel M. Chougule, Shujun Ou, Jianing Liu, William A. Ricci, et al. « De Novo Assembly, Annotation, and Comparative Analysis of 26 Diverse Maize Genomes ». *Science (New York, N.Y.)* 373, n° 6555 (6 août 2021): 655-62. <https://doi.org/10.1126/science.abg5289>.

Jacob, Pierre, Adi Avni, et Abdelhafid Bendahmane. « Translational Research: Exploring and Creating Genetic Diversity ». *Trends in Plant Science* 23, n° 1 (1 janvier 2018): 42-52. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.10.002>.

Krasileva, Ksenia V., Hans A. Vasquez-Gross, Tyson Howell, Paul Bailey, Francine Paraiso, Leah Clissold, James Simmonds, et al. « Uncovering Hidden Variation in Polyploid Wheat ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, n° 6 (7 février 2017): E913-21. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619268114>.

Li, Guotian, Mawsheng Chern, Rashmi Jain, Joel A. Martin, Wendy S. Schackwitz, Liangrong Jiang, Miguel E. Vega-Sánchez, et al. « Genome-Wide Sequencing of 41 Rice (*Oryza Sativa* L.) Mutated Lines Reveals Diverse Mutations Induced by Fast-Neutron Irradiation ». *Molecular Plant* 9, n° 7 (6 juillet 2016): 1078-81. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.03.009>.

Gallais. « De la domestication à la transgénèse - Évolution des outils pour l'amélioration des plantes » - André Gallais (EAN13 : 9782759220243) | Librairie Quae : des livres au coeur des sciences ». 2019. <https://www.quae.com/produit/1167/9782759220243/de-la-domestication-a-la-transgenese>.

Nonaka, Satoko, Chikako Arai, Mariko Takayama, Chiaki Matsukura, et Hiroshi Ezura. « Efficient Increase of γ -Aminobutyric Acid (GABA) Content in Tomato Fruits by Targeted Mutagenesis ». *Scientific Reports* 7, n° 1 (1 août 2017): 7057. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06400-y>.

Proposition de règlement du Parlement européen et du Conseil du 5 juillet 2023 concernant les végétaux obtenus au moyen de certaines nouvelles techniques génomiques et les denrées alimentaires et aliments pour animaux qui en sont dérivés, et modifiant le règlement (UE) 2017/625.

Quiroz, Daniela, Mariele Lensink, Daniel J. Kliebenstein, et J. Grey Monroe. « Causes of Mutation Rate Variability in Plant Genomes ». *Annual Review of Plant Biology* 74 (22 mai 2023): 751-75. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070522-054109>.

Règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés. JO L 268 du 18.10.2003, pp. 1-23.

Sánchez-León, Susana, Javier Gil-Humanes, Carmen V. Ozuna, María J. Giménez, Carolina Sousa, Daniel F. Voytas, et Francisco Barro. « Low-Gluten, Nontransgenic Wheat Engineered with CRISPR/Cas9 ». *Plant Biotechnology Journal* 16, n° 4 (avril 2018): 902-10. <https://doi.org/10.1111/pbi.12837>.

Sturme, Mark H. J., Jan Pieter van der Berg, Lianne M. S. Bouwman, Adinda De Schrijver, Ruud A. de Maagd, Gijs A. Kleter, et Evy Battaglia-de Wilde. 2022. « Occurrence and Nature of Off-Target Modifications by CRISPR-Cas Genome Editing in Plants ». *ACS Agricultural Science & Technology* 2 (2): 192-201. <https://doi.org/10.1021/acsagascitech.1c00270>.

Szurman-Zubrzycka, Miriam, Marzena Kurowska, Bradley J. Till, et Iwona Szarejko. « Is it the end of TILLING era in plant science? » *Frontiers in Plant Science* 14 (2023). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2023.1160695>.

Wang TL, Uauy C, Robson F, Till B (2012) Tilling in extremis. *Plant Biotechnology journal* 10, 761-772. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1467-7652.2012.00708.x>

Wang, Yanpeng, Xi Cheng, Qiwei Shan, Yi Zhang, Jinxing Liu, Caixia Gao, et Jin-Long Qiu. « Simultaneous Editing of Three Homoeoalleles in Hexaploid Bread Wheat Confers Heritable Resistance to Powdery Mildew ». *Nature Biotechnology* 32, n° 9 (septembre 2014): 947-51. <https://doi.org/10.1038/nbt.2969>.

CITATION SUGGEREE

Anses. (2023). Avis relatif à l'analyse scientifique de l'annexe I de la proposition de règlement de la Commission européenne du 5 juillet 2023 relative aux nouvelles techniques génomiques (NTG) – Examen des critères d'équivalence proposés pour définir les plantes NTG de catégorie 1 (autosaisine n° 2023-AUTO-0189). Maisons-Alfort : Anses, 34 p.

ANNEXE 1



Décision N° 2023-182

AUTOSAISINE

Le directeur général de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses),

Vu le code de la santé publique, et notamment son article L. 1313-3 conférant à l'Anses la prérogative de se saisir de toute question en vue de l'accomplissement de ses missions,

Décide :

Article 1^{er} : L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail se saisit afin de réaliser une expertise dont les caractéristiques sont listées ci-dessous.

1.1 Thématiques et objectifs de l'expertise

Analyse scientifique de l'annexe I de la proposition de règlement de la Commission européenne du 5 juillet 2023 relative aux nouvelles techniques génomiques (NTG) – Examen des critères d'équivalence proposés pour définir les plantes NTG de catégorie 1.

1.2 Contexte de l'autosaisine

Depuis l'adoption de la directive 2001/18/CE relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés (OGM) dans l'environnement, les progrès scientifiques et techniques ont permis le développement de nouvelles techniques de modification génétique qui ont fait l'objet d'interrogations quant à savoir si leurs produits relevaient de la définition des OGM et du champ d'application de cette directive.

A la suite de l'arrêt de la Cour de justice de l'Union européenne dans l'affaire C-528/16 (Arrêt de la Cour de justice du 25 juillet 2018), qui concluait que les nouvelles techniques de mutagenèse relevaient du champ d'application de cette directive tout en soulevant des questions pratiques d'applicabilité, le Conseil invitait la Commission à soumettre une étude concernant le statut des « nouvelles techniques génomiques » dans le droit de l'Union (Décision (UE) 2019/1904 du Conseil du 8 novembre 2019).

Dans son étude du 29 avril 2021, la Commission concluait que la législation actuelle de l'Union européenne (UE) sur les OGM n'était pas adaptée à certaines de ces « nouvelles techniques génomiques » (NTG), formellement définies pour la première fois comme les « techniques capables de modifier le matériel génétique d'un organisme, qui ont émergé ou se sont développées principalement depuis 2001 ». En particulier, l'évaluation des risques prévue par la législation actuelle a été jugée parfois inadéquate ou disproportionnée et les exigences de détection souvent inapplicables pour les plantes et produits de plantes obtenus par des techniques de mutagenèse ciblée ou de cisgénèse.

La proposition de règlement relative aux NTG adoptée le 5 juillet 2023 par la Commission européenne, dont l'intention est d'apporter une réponse adaptée et mesurée aux interrogations soulevées par l'émergence de ces nouvelles techniques, opte pour une *lex specialis*. Ainsi les règles énoncées dans le règlement proposé prévaudraient sur la législation en vigueur, principalement la directive 2001/18/CE et le règlement (CE) n° 1829/2003 pour ce qui



concerne la mise sur le marché de plantes, produits ou éléments de produits issus de ces plantes à des fins alimentaires.

Parmi les plantes modifiées par NTG (au sens préexistant du terme), le règlement proposé définit le végétal NTG comme « un végétal génétiquement modifié obtenu par mutagenèse ciblée ou cisgénèse, ou une combinaison des deux, à condition qu'il ne contienne aucun matériel génétique ne provenant pas du pool génétique des obtenteurs qui aurait pu être inséré temporairement au cours du développement du végétal NTG ». Parmi les plantes NTG considérées, deux catégories sont distinguées. Les plantes de catégorie 1, mentionnées comme pouvant également être obtenues naturellement ou par sélection conventionnelle, sont définies par des critères dits d'équivalence aux plantes conventionnelles énoncés en annexe I de la proposition de règlement. La justification des critères d'équivalence retenus a fait l'objet d'un document technique de la commission européenne émis le 16 octobre. Dès lors que leur statut serait reconnu, ces plantes ne seraient plus soumises à la législation de l'UE sur les OGM. A contrario, les plantes NTG qui ne sont pas de catégorie 1 sont de catégorie 2 et resteraient soumises à la législation OGM dans la limite de dispositions et dérogations spécifiques.

Cette proposition législative revêt différents enjeux pour l'Anses selon les stades d'avancement, de la procédure d'adoption à la mise en œuvre du règlement. A court terme, le règlement doit être adopté selon la procédure législative ordinaire, impliquant des débats et votes au sein du Parlement européen et du Conseil. A ce stade de négociations, l'Anses pourrait contribuer à :

- éclairer la décision publique, en fournissant une analyse de la proposition réglementaire aux autorités compétentes françaises en accompagnement des débats et votes à venir au Conseil ;
- alimenter et éclairer le débat public et législatif, en publiant une analyse pour l'information de la société, incluant les simples citoyens et les parties prenantes, dont les parlementaires qui participeront aux débats et votes à venir au Parlement européen.

Considérant les délais contraints, l'analyse menée va se concentrer sur l'examen des critères d'équivalence envisagés pour définir les plantes NTG de catégorie 1. Ce point est estimé parmi les plus sensibles de la proposition législative, du fait qu'il crée une catégorie de plantes génétiquement modifiées qui seraient exemptées de l'application des exigences de la législation de l'Union européenne sur les OGM.

Cette autosaisine s'inscrit en complément à la saisine relative aux travaux de fond sur les méthodes d'évaluation des risques liés à l'utilisation des OGM en alimentation animale et humaine, incluant une réflexion méthodologique sur de possibles adaptations des requis d'évaluation des risques sanitaires et environnementaux des plantes issues des NTG, en particulier de CRISPR-Cas9 et des techniques apparentées (programme de travail 2023 de la Direction de l'évaluation des risques, Fiche 1.1.4 METHEVALOGM).

1.3 Questions sur lesquelles portent les travaux d'expertise à mener

Le projet de règlement adopté par la Commission le 5 juillet 2023 relatif aux NTG propose de soustraire de la législation OGM certaines plantes modifiées génétiquement par des NTG au motif qu'elles seraient équivalentes à des plantes conventionnelles. Cette autosaisine se concentre sur les critères envisagés par le projet de règlement pour conclure à l'équivalence de certaines plantes NTG avec des plantes conventionnelles.

Les plantes concernées, dites plantes NTG de catégorie 1, par cette équivalence sont conjointement définies par :

- le périmètre des plantes considérées par le projet de règlement, désignées plantes NTG ou « végétaux NTG » dans le règlement,
- l'application des critères dits « d'équivalence aux plantes conventionnelles », énoncés en annexe I du projet de règlement.

L'analyse conjointe des critères de l'annexe I et de leurs justifications dans le document technique de la commission européenne ainsi que la définition des plantes NTG considérées dans le règlement devrait être réalisée dans l'objectif

L'analyse conjointe des critères de l'annexe I et de leurs justifications dans le document technique de la commission européenne ainsi que la définition des plantes NTG considérées dans le règlement devrait être réalisée dans l'objectif de répondre à la question clef suivante : dans quelle mesure les plantes ainsi définies peuvent-elles être effectivement considérées comme équivalentes à des plantes conventionnelles ?

Dans un double objectif de clarification et d'analyse critique, ces travaux viseront à :

- clarifier les critères d'équivalence envisagés dans l'annexe I et sous-tendus par le document technique du projet de règlement pour définir les plantes NTG de catégorie 1 pour une meilleure lisibilité de la proposition législative,
- souligner d'éventuelles questions ou limites dans la définition de ces critères, en examinant leur fondement scientifique et en s'interrogeant sur l'utilité de critères supplémentaires.

1.4 Durée prévisionnelle de l'expertise

L'expertise est prévue jusqu'à la fin du mois de novembre.

Article 2.- Un avis sera émis et publié par l'Agence à l'issue des travaux.

Fait à Maisons-Alfort, le

06 NOV. 2023


Pr Benoît VALLET
Directeur général