



# **Saisine du Comité Scientifique CTPS** **Nouvelles techniques d'édition du génome et** **évaluation des variétés**

Laure Jolly, Aurélia Gouleau, Bénédicte Bakan, Virginie Bertoux, Stéphane Cordeau, Jérôme Enjalbert, Arnaud Gauffreteau, Julie Gombert, David Gouache, Anne Laperche, Valérie Leclère, Christel Leyronas, Fabrice Lheureux, Valérie Mazza, Frédéric Moquet, Delphine Tailliez, Patrice This, Anne Wagner, Christian Huyghe

Novembre 2022

## TABLE DES MATIERES

|  |           |
|--|-----------|
| DEFINITIONS .....  | 3         |
| LISTE DES ABREVIATIONS.....  | 5         |
| <b>INTRODUCTION .....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>1. EVOLUTION DES NBTs ET DES TECHNIQUES D'EDITION DU GENOME ET INCIDENCE SUR L'OFFRE VARIETALE .....</b>  | <b>10</b> |
| <b>1.1.Evolution des NBTs et des techniques d'édition du génome.....</b>   | <b>10</b> |
| 1.1.1.Définitions des NBTs et techniques d'édition du génome .....   | 10        |
| 1.1.2.L'utilisation des NBTs et des techniques d'édition du génome jusqu'en 2016 .....   | 12        |
| 1.1.3.L'évolution des NBTs et des techniques d'édition du génome depuis 2016 .....   | 12        |
| <b>1.2.L'utilisation des techniques d'édition du génome à des fins d'amélioration variétale.....</b>   | <b>19</b> |
| 1.2.1.Rendement .....  | 20        |
| 1.2.2.Modification des propriétés nutritionnelles, organoleptiques et technologiques .....   | 21        |
| 1.2.3.Résistance aux stress abiotiques.....  | 24        |
| 1.2.4.Résistance aux stress biotiques .....  | 26        |
| 1.2.5.Des améliorations multiples .....  | 28        |
| <b>2. L'EVALUATION DES VARIETES ISSUES DE NBTs .....</b>   | <b>29</b> |
| <b>2.1.Les services et disservices potentiels des variétés éditées.....</b>  | <b>29</b> |
| 2.1.1.Les services attendus .....  | 29        |
| 2.1.2.Les disservices potentiels .....   | 31        |
| 2.1.3.Services et disservices : spécificités liées aux NBTs.....   | 33        |
| <b>2.2.Comment évaluer les variétés éditées lors de l'inscription ? .....</b>  | <b>34</b> |
| 2.2.1.Rappel sur l'inscription des variétés .....  | 34        |
| 2.2.2.Evaluer les variétés selon leurs caractéristiques ou selon les méthodes d'obtention ?.....   | 35        |
| 2.2.3.Le système d'inscription actuel permet l'évaluation des traits édités .....  | 37        |
| 2.2.4.L'évaluation des caractères édités très impactants .....   | 37        |
| <b>2.3.Suivi et évaluation des variétés après leur inscription.....</b>  | <b>38</b> |
| 2.3.1.Importance de la surveillance .....  | 38        |
| 2.3.2.La détection des variétés issues des NBTs.....   | 40        |
| 2.3.3.Importance de la traçabilité .....   | 42        |
| <b>3 INCIDENCE DE LA MISE EN MARCHÉ DE VARIETES ISSUES DES NBTs ..44</b>   | <b>44</b> |
| <b>3.1.Coexistence entre les variétés éditées et les autres variétés .....</b>   | <b>44</b> |
| 3.1.1.Exemple de la coexistence variétés OGM et non OGM .....  | 44        |
| 3.1.2.Incidence de la mise en marché des variétés éditées sur les filières semences.....   | 46        |
| 3.1.3.Incidence de la mise en marché des variétés éditées sur les ressources génétiques.....   | 50        |
| <b>3.2.Propriété Intellectuelle des variétés issues de NBTs, et incidence des différents types de Propriété Intellectuelle sur le marché .....</b> | <b>51</b> |
| 3.2.1.Types de Propriété Intellectuelle applicables aux variétés / inventions liées aux plantes, en France et dans l'Union Européenne .....        | 51        |
| 3.2.2.Incidence des différents types de Propriété Intellectuelle sur la filière semences et plants.....  | 54        |
| 3.3.Vers une accélération des créations variétales grâce à l'édition des génomes ?.....  | 57        |
| <b>CONCLUSION .....</b>  | <b>60</b> |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....   | 63        |
| ANNEXE 1 : LETTRE DE CADRAGE DE LA SAISINE .....   | 88        |
| ANNEXE 2 : EVOLUTIONS DES NBTs ET DES TECHNIQUES D'EDITION DU GENOME DEPUIS 2016 .....   | 91        |
| ANNEXE 3 : TABLEAUX RECAPITULATIFS DES TRAITS TRAVAILLES PAR LA METHODE CRISPR/CAS...104   | 104       |
| ANNEXE 4 : ETUDES DE CAS DES SERVICES ET DISSERVICES .....   | 113       |

## Définitions

**Abiotique** : Se dit d'un facteur lié au milieu, indépendant des êtres vivants [53\*]

**Apomixie** : Mode de multiplication asexuée sans fécondation et avec méiose modifiée.

**Biotique** : Relatif au monde vivant [52\*]

**Chromatine** : Forme sous laquelle se présente l'ADN dans le noyau de la cellule.

**Chromosomes homéologues** : Chromosomes présentant une certaine similitude génique mais qui ne s'apparient ou ne se recombinent que dans des circonstances exceptionnelles.

**Cisgène** : Séquence génique provenant de la même espèce ou d'une espèce sexuellement compatible à l'organisme receveur.

**Crossing-Over** : Recombinaison génétique lors de la méiose entre chromosomes homologues.

**Disservice** : Action qui cause du tort à quelqu'un ou quelque chose.

**Disservices intrinsèques** : Ce terme désigne les effets négatifs provoqués par le déploiement de traits/caractères d'une plante éditée sur la plante elle-même.

**Disservices écosystémiques** : Ce terme désigne les effets négatifs provoqués par le déploiement de traits/caractères d'une plante éditée sur l'écosystème, par un enchaînement d'événements, tels que les interactions avec d'autres organismes, le transfert de matériel génétique, etc...

**Disservices santé/qualité/nutrition** : Ce terme désigne les effets négatifs provoqués par le déploiement de traits/caractères d'une plante éditée sur la santé humaine ou animale, par leur utilisation et leur consommation, avec ou sans transformations.

**Endogène** : Gène présent de manière naturelle dans le génome de l'organisme.

**Épigénétique** : Mécanismes moléculaires qui modulent l'expression des gènes sans modifier la séquence nucléotidique.

**Epimutation** : Processus de mutation épigénétique. [43\*]

**Gènes homologues** : Il s'agit de gènes qui descendent d'une séquence d'ADN ancestrale commune qui conservent des caractéristiques similaires. [41\*]

**Epitranscriptome** : Ensemble de modifications chimiques présentes sur les molécules d'ARN dans les cellules. [42\*]

**Génotype** : Information génétique de l'ensemble ou d'une partie donnée d'un individu.

**Hétérozygotie** : Au niveau d'un gène, l'hétérozygotie décrit la présence de deux allèles différents au même locus.

**Histones** : Constituants protéiques des chromosomes permettant leur compaction et leur décompaction.

**Homozygotie** : Au niveau d'un gène, l'homozygotie décrit la présence de deux allèles identiques au même locus.

**Hybridation** : Fécondation croisée de l'ovule d'une plante par le pollen d'une autre plante [47\*]

**Intron** : Portion de gène non retrouvée dans l'ARN cytoplasmique après épissage.

**Locus** : Emplacement physique invariable sur un chromosome

**Nucléase** : Enzyme capable couper des séquences d'acides nucléiques.

**Plasmide** : Molécule d'ADN circulaire présente chez les bactéries et non essentielles à la survie de la cellule.

**Ploïdie** : Nombre d'exemplaires de jeux complets des chromosomes au sein d'un organisme ou d'une cellule.

**Rétrocroisements** : Croisements successifs d'un hybride avec l'un de ses parents.

**Transgène** : Séquence génique provenant d'une espèce non sexuellement compatible à l'organisme receveur.

**Variations somaclonales** : Changements génétiques ou épigénétiques qui surviennent *in vitro* entre les régénérants clonaux et leurs plantes donneuses correspondantes (Leva et Rinaldi, 2017)

## Liste des abréviations

**ABE** : *Adenine Base Editor* ou « Editeur de la base adénine »

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN** : acide ribonucléique

**C.O.V.B** : composés Organiques Volatils Biogéniques

**Cas9** : CRISPR associated protein 9 ou « protéine 9 associée à CRISPR »

**CBE** : *Cytosine Base Editor* ou « éditeur de la base cytosine »

**CJUE** : Cour de Justice de l'Union Européenne

**COV** : Certificat d'Obtention Végétale

**CPI** : Code de la Propriété Intellectuelle

**CRISPR** : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* ou « courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées »

**CTPS** : Comité Technique Permanent de la Sélection des Plantes Cultivées

**DHS** : Distinction Homogénéité Stabilité

**DSB** : *Double Strand Break* ou « Cassure Double Brin »

**EFSA** : *Europe Food Safety Authority* ou « Autorité européenne de sécurité des aliments »

**ENGL** : *European Network of GMO Laboratories* ou « Réseau européen des laboratoires d'OGM »

**EPA** : *Environmental Protection Agency* ou « Agence de protection de l'environnement »

**IFOAM** : International Federation of Organic Agriculture Movements ou « Fédération internationale des mouvements d'agriculture biologique »

**INOV** : Instance Nationale des Obtentions Végétales

**NBT ou NGT** : *New Breeding Techniques (New Genomic Techniques)*, nouvelles techniques de sélection des plantes basées sur l'édition du génome.

**NGS** : *Next Generation sequencing* ou « Séquençage de nouvelle génération »

**OCVV** : Office communautaire des variétés végétales

**OEB** : Office européen des Brevets

**OGM** : Organisme Génétiquement Modifié

**PAM** : *Protospacer adjacent motif*

**PCR** : *Polymerase Chain Reaction* ou « réaction de polymérisation en chaîne »

**PID** : *PAM Interacting Domain* ou « Domaine d'interaction PAM »

**PMEM** : *post-market environmental monitoring plan* ou « plan de surveillance environnementale post-commercialisation »

**RNP** : Ribonucléoprotéine

**RPG** : Ressources PhytoGénétiques

**SDN** : *Site Directed Nucleases* ou « Nucléases dirigées vers le site »

**SIGMEA** : Sustainable Introduction of GM crops into European Agriculture ou « Introduction durable des cultures GM dans l'agriculture européenne »

**STEME** : Saturated targeted endogenous mutagenesis editor ou « Éditeur de mutagénèse endogène ciblée saturée »

**TALEN** : Transcription activator-like effector nuclease

**UPOV** : Union pour la protection des obtentions végétales

**VATE** : Valeur Agronomique, Technologique et Environnementale

**ZFN** : Zinc-Finger protein

# Introduction

## Le Comité Technique Permanent de la Sélection des plantes cultivées

Le CTPS, Comité Technique Permanent de la Sélection des Plantes Cultivées, est une commission administrative à caractère consultatif assurant une mission de conseil et d'appui technique auprès du ministère chargé de l'agriculture concernant les variétés, semences et plants. Le CTPS est également chargé de l'établissement du catalogue officiel des espèces et variétés de plantes cultivées, et de l'instruction et du suivi de l'application des règlements techniques concernant la production, le contrôle et la certification variétale et sanitaire des semences et plants (Code rural et de la pêche maritime). Le CTPS mobilise plus de 800 personnes, représentants de l'administration, experts scientifiques, et professionnels de l'obtention de nouvelles variétés, de la multiplication des semences et plants, de la production ou de l'utilisation des produits de récolte, sur une large gamme d'espèces (espèces forestières, vigne, légumières, ornementales, fourragères et agricoles). Cette participation large aux réflexions du CTPS permet aux pouvoirs publics français de mettre en œuvre une réglementation en matière de variétés, semences et plants co-construite, à la croisée entre les ambitions des pouvoirs publics en matière de politiques publiques, la réalité des professionnels et l'éclairage scientifique. L'élaboration par le CTPS d'un projet de plan ministériel « Semences et Plants pour une Agriculture Durable », homologué dans sa première version en 2016, et ayant fait l'objet d'une révision en 2021, illustre l'action d'appui et de conseil technique exercée par le CTPS pour le compte du Ministère chargé de l'agriculture. Organisé en 14 sections constituées par groupe(s) d'espèces, une section dédiée à la conservation des ressources phytogénétiques, deux commissions inter-sections dédiées aux plantes de services et à l'Agriculture Biologique, et un Comité Plénier, le CTPS peut s'appuyer sur un Comité Scientifique, mobilisé pour apporter un éclairage scientifique utile aux travaux du CTPS ou aux autorités françaises en amont de l'élaboration de la réglementation.

## Contexte autour des nouvelles techniques d'édition du génome

En 2016, le Comité Scientifique du CTPS a mené une première étude sur les nouvelles techniques de sélection des plantes (NBTs), notamment les techniques d'édition du génome, afin de répondre aux questions suivantes :

- Quels sont les impacts potentiels de ces nouvelles techniques de sélection des plantes sur l'offre variétale ?
- Quels pourraient être les impacts de ces nouvelles techniques de sélection des plantes sur les activités du CTPS ?

Depuis, un arrêt de la Cour de Justice de l'Union européenne (CJUE) du 25 juillet 2018 sur la mutagenèse a clarifié le statut juridique des produits issus de NBT au regard de la réglementation OGM. Ceux-ci sont soumis aux obligations de la réglementation OGM : évaluation des risques, autorisation, traçabilité, étiquetage, surveillance.

A la demande du Conseil de l'UE, la Commission a publié le 29 avril 2021 une étude sur le statut des NBT dans le droit de l'UE. L'étude conclut que la réglementation actuelle n'est pas adaptée pour certaines NBT et leurs produits, et qu'il est donc nécessaire de l'adapter aux progrès scientifiques et technologiques.

La Commission a annoncé en 2021 une action politique sur les plantes issues de mutagenèse ciblée et de cisgénèse. Il s'agirait d'adapter les procédures d'autorisation et d'évaluation des risques ainsi que les exigences de traçabilité et d'étiquetage, tout en maintenant un haut niveau de protection de la santé et de l'environnement. Cette initiative fait l'objet d'une étude d'impact qui pourra déboucher sur une modification du cadre réglementaire européen. Les différentes options réglementaires ne sont pas encore définies et sont explorées lors de l'étude d'impact.

Dans ce contexte, un éclairage du Comité Scientifique du CTPS est sollicité sur les NBT, au titre de l'action 25 du plan SPAD-2 sur la mobilisation des acquis scientifiques disponibles pour l'élaboration ou l'évolution des cadres réglementaires.

Le besoin d'éclairage concerne en particulier l'évaluation des services des variétés obtenues à l'issue de l'usage des NBTs, services évalués au regard des objectifs de la transition agroécologique.

En effet, l'étude de la Commission européenne soulève la question de l'évaluation des bénéfices des produits issus de NBT pour la durabilité afin de contribuer aux objectifs du Pacte Vert pour l'Europe et des stratégies « De la ferme à la table » et de biodiversité. Lors du Conseil Agriculture des 26-27 mai 2021, le Ministre français chargé de l'agriculture a également mis en avant l'importance de la finalité des variétés issues de NBTs. Il a précisé que cette finalité doit être cohérente avec les priorités de transition écologique de l'agriculture et de souveraineté alimentaire, citant par exemple des plantes qui résistent mieux à la sécheresse pour réduire la consommation d'eau, ou qui résistent à des ravageurs pour réduire le recours aux pesticides. Il considère à l'inverse que développer de nouvelles variétés tolérantes aux herbicides ne serait pas souhaitable.

## Objet de la saisine

Le Directeur général de l'Alimentation a formellement saisi en novembre 2021 le Président du Comité Scientifique du CTPS (Annexe 1) afin qu'il éclaire, sur la base de la littérature scientifique et technique, l'incidence de l'évolution des techniques d'édition du génome sur l'évaluation des variétés.

Ce rapport présente les travaux du Comité Scientifique du CTPS sur les nouvelles techniques d'édition du génome et l'évaluation des variétés issues de ces nouvelles techniques de sélection des plantes (NBT pour New Breeding Techniques), en réponse à cette saisine du Ministère chargé de l'agriculture. La méthode CRISPR/Cas 9 est une méthode qui a connu un essor très important ces dernières années (figure 0), devenant aujourd'hui la méthode la plus utilisée. Dans la suite du rapport, nous nous sommes intéressés à cette technique d'édition du génome en particulier, et nous avons extrapolé les réflexions aux autres techniques d'édition du génome et NBTs. Dans un contexte technologique encore évolutif, les recommandations s'appuient sur les connaissances actuelles des techniques d'édition et de leur potentiel d'application.

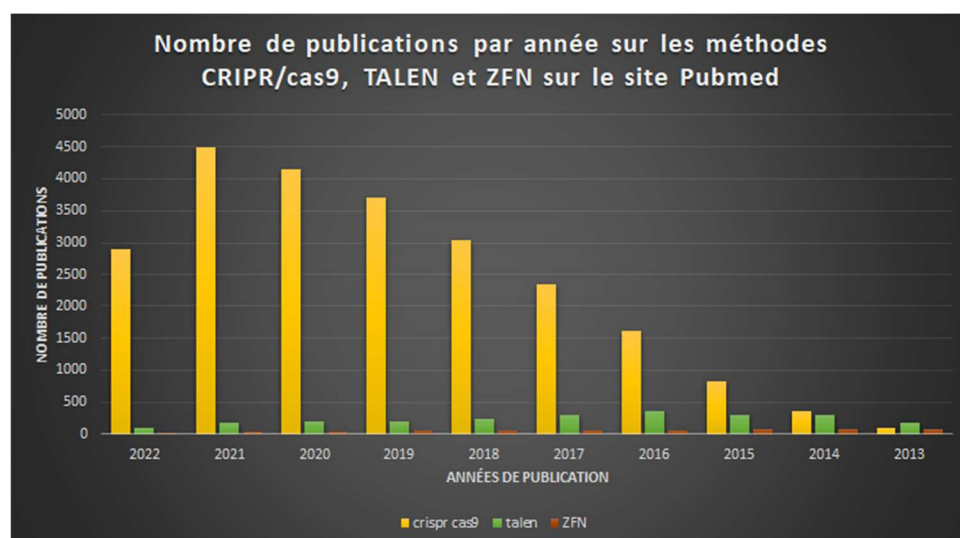


Figure 0 Nombre de publications sur le site Pubmed selon le type de nucléase utilisée. Extraction réalisée le 10 octobre 2022.



## Questions traitées dans la saisine

L'expertise scientifique conduite par le Comité Scientifique a porté sur les trois volets suivants :

**- Une actualisation du rapport de novembre 2016 au regard des développements techniques intervenus depuis.**

Le Comité Scientifique a examiné si ces développements techniques étaient susceptibles de modifier son analyse de 2016 sur les conséquences possibles des NBT sur l'offre variétale. La première partie du rapport fait état de l'évolution des techniques d'édition du génome, et plus particulièrement de CRISPR/Cas 9 depuis 2016, et présente les caractères édités actuellement par ces techniques.

**- Un approfondissement de la réflexion sur l'évaluation des variétés issues de NBTs**

Le rapport du CTPS de 2016 abordait la question de l'évaluation des services et disservices des traits nouveaux. Le Comité Scientifique du CTPS a poursuivi la réflexion sur ce sujet. La deuxième partie du rapport aborde la question des services et disservices potentiels apportés par les variétés éditées dans le cadre de la transition agroécologique et alimentaire, sur la base d'études de cas spécifiques, et émet des recommandations sur la manière d'évaluer ces variétés. La réflexion a concerné en particulier les traits susceptibles d'être développés par les techniques de mutagenèse ciblée.

**- Une étude sur l'incidence de la mise en marché de variétés issues de NBTs, en termes de coexistence de deux types de variétés, et de Propriété Intellectuelle**

Sur la base de réflexions antérieures sur la coexistence de variétés OGM et non OGM, le Comité Scientifique du CTPS a identifié l'impact potentiel de la coexistence de variétés issues de NBT et non issues de NBT sur les filières de production et de transformation, et sur l'exploitation des variétés. L'incidence des différents types de propriété intellectuelle en lien avec les variétés éditées sur les marchés des semences et des variétés a également été abordée.

## Déroulement de la saisine

Cette saisine s'est déroulée de décembre 2021 à octobre 2022.

Au mois de janvier 2022, une journée de réflexion du Comité Scientifique a été consacrée à l'étude des développements techniques réalisés en matière d'édition du génome depuis 2016, sur la base de la littérature scientifique et d'une présentation faite au Comité Scientifique du CTPS par Fabien Nogué, Directeur de recherche à l'IJPB, INRAE, à Versailles et spécialiste des mécanismes de réparation de l'ADN et des nouvelles technologies d'édition des génomes. Le CS du CTPS s'est réuni en mai afin de formuler des recommandations sur l'évaluation des services et disservices apportés par les variétés éditées et liés à leur déploiement. Au mois de juin, le Comité Scientifique a étudié l'incidence de la mise en marché de variétés éditées, sous l'angle de la coexistence entre différents types de variétés et de la Propriété Intellectuelle applicable, sur la base de réflexions menées sur la coexistence entre variétés OGM et non-OGM, présentées au CS du CTPS par Antoine Messéan, Ingénieur agronome travaillant à INRAE, Eric Gall, Directeur adjoint d'IFOAM Organic Europe, et Yves Bertheau, directeur de recherche INRAE au Muséum national d'histoire naturelle, et sur la base de présentations sur la propriété intellectuelle des variétés faites au CS du CTPS par Angela Martinez, juriste à l'OCVV, et Magali Pla, Directrice adjointe chargée des questions de propriété industrielle au sein du groupe Limagrain. En septembre 2022, un séminaire a rassemblé les membres du Comité Scientifique, les présidents et les secrétaires techniques des sections et commissions inter-sections du CTPS, afin de partager les éléments de réflexion des sections sur les caractères intéressants dans le cadre de la transition agroécologique et alimentaire, qui pourraient être obtenus par édition du génome, et ceci pour la très large diversité des espèces couvertes par les travaux du CTPS. Les principaux enseignements et les conclusions de cette saisine ont été présentés au Comité Plénier du CTPS en novembre 2022.

# 1. Evolution des NBT et des techniques d'édition du génome et incidence sur l'offre variétale

## 1.1. Evolution des NBT et des techniques d'édition du génome

### 1.1.1. Définitions des NBT et techniques d'édition du génome

#### Les NBTs

En 2007, un groupe de travail mis en place par la Commission européenne a identifié un ensemble de huit techniques de sélection des plantes (ou « N(P)BT » selon l'acronyme anglais « New (Plant) Breeding Techniques »). L'ensemble des huit nouvelles techniques de sélection des plantes listées par la Commission européenne ont en commun de permettre l'affranchissement de certaines limitations existantes en sélection classique, en vue de produire des plantes avec les caractéristiques souhaitées de manière plus rapide et précise.

#### Les techniques d'édition du génome

Parmi les huit NBTs, les techniques de mutagenèse dirigée par oligonucléotide (ODM) et les techniques de mutagenèse dirigées par nucléases (SDN) sont dites « techniques d'édition du génome ». Elles permettent une « chirurgie » fine et précise des génomes nucléaires, mitochondriaux (Jo *et al.*, 2015 ; Bacman *et al.*, 2013) ainsi que ceux des différents plastes cellulaires (Ort *et al.*, 2015 ; Martin Avila, Gisby et Day, 2016), et ce par la création de modifications dans la séquence nucléotidique de l'ADN au niveau de cibles prédéterminées et choisies, ces cibles pouvant être ou non une séquence génique (Swinnen, Goossens, et Pauwels, 2016; Quétier, 2016). L'ensemble des techniques de création variétale par édition du génome repose sur les mécanismes naturels de réparation de l'ADN activés par la plante en cas de dommage ou d'anomalie sur la séquence nucléotidique. Ces mécanismes naturels de réparation peuvent « commettre des erreurs » sur l'ADN créant des mutations (changement de nucléotide, délétion, insertion) au site d'altération de l'ADN.

La technique d'édition du génome la plus prometteuse fait intervenir les enzymes de type nucléases dirigées (ou « SDN » selon l'acronyme anglais « Site Directed Nucleases ») qui possèdent la capacité de couper les brins d'ADN au niveau d'une cible prédéfinie après hybridation spécifique de cette nucléase. La coupure de la double hélice d'ADN par la SDN va activer les mécanismes naturels de réparation de l'ADN propres à la plante permettant de créer une mutation non prédéfinie (insertion ou délétion) au point de coupure, de créer une mutation prédéfinie en présence d'une matrice de réparation homologue ou encore de modifier précisément l'ADN par l'insertion d'une matrice ADN spécifique.

Les SDN peuvent être divisées en trois catégories, SDN1, SDN2 et SDN3 (Gendre, 2016).

- Les éditions du génome de type **SDN1** résultent de la coupure de l'ADN par une ou plusieurs nucléases dirigées, ceci en l'absence de matrice de réparation. Les éditions de type SDN1 reposent sur les mécanismes de réparation de l'ADN par jonction des extrémités non-homologues.
- Les éditions du génome de type **SDN2** résultent de la modification de quelques nucléotides sur l'ADN cible en présence d'une matrice de réparation homologue, celle-ci différant uniquement de quelques nucléotides par rapport à la séquence initiale.
- Les éditions du génome de type **SDN3** résultent en l'insertion ciblée de larges séquences d'ADN, partiellement homologues, suite à la coupure de l'ADN cible par

des nucléases dirigées. Cette matrice de réparation homologue pourra être utilisée comme référence par les mécanismes de réparation de l'ADN de type RH (recombinaison homologue) afin d'intégrer de manière ciblée la séquence souhaitée. Parmi les éditions de type SDN3, il y a la cisgénèse ciblée, qui consiste en l'introduction d'une séquence génique provenant de la même espèce ou d'une espèce sexuellement compatible à l'organisme receveur. Elles sont introduites de façon ciblée dans le génome.

A ce jour, quatre familles de nucléases dirigées sont ou ont été utilisées dans les laboratoires de recherche (Kim et Kim 2014 ; Petolino et Kumar 2016) : les méganucléases, les ZFNs, les TALENs et les nucléases de type CRISPR/Cas.

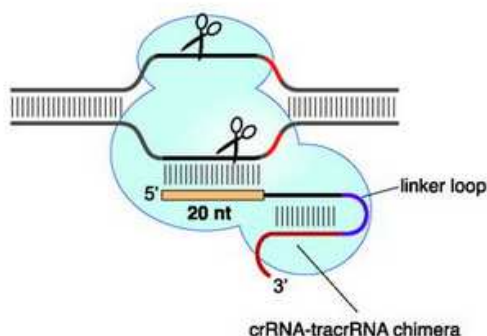
### CRISPR/Cas9

La dernière technologie SDN découverte est la technologie CRISPR/Cas9 (des acronymes anglais « Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats » / « CRISPR Associated Protein 9 ») (Charpentier et Doudna, 2013).

C'est à l'heure actuelle la nucléase la plus utilisée et étudiée que ce soit en recherche fondamentale ou appliquée, en biologie animale, humaine, végétale et microbienne. La grande avancée qu'apporte cette nucléase par rapport aux technologies plus anciennes n'est pas liée à sa fonction qui reste identique, mais à son accessibilité technique et financière qui en fait un outil potentiellement abordable à davantage de laboratoires et permettant des éditions multi-cibles (Xie, Minkenberg et Yang, 2015 ; Raitskin et Patron, 2016).

Les nucléases de type CRISPR/Cas9 sont des enzymes naturelles du système de défense bactérien permettant de combattre les infections virales. Elles sont composées d'une nucléase protéique de type Cas9 et d'un ARN guide. L'expression du locus CRISPR par la cellule et la maturation de son produit permet la production de courts ARNs répétés (les crRNA) correspondant à plus ou moins 20 nucléotides spécifiques de l'ADN cible. Ces crRNAs s'apparient à d'autres ARNs de petite taille (les tracrRNA) afin de former la séquence d'ARN guide. La protéine endonucléasique Cas9 reconnaît ce complexe ARN guide et viendra s'y fixer afin de former la SDN active spécifique de la cible (Figure 1) (Jinek *et al.*, 2012).

Cas9 programmed by single chimeric RNA



**Figure 1** Organisation moléculaire des nucléases de type CRISPR/Cas9 (d'après Jinek *et al.*, 2012). Organisation en monomère des nucléases de type CRISPR/Cas9. Le crRNA est associé au tracrRNA pour reconnaître spécifiquement l'ADN cible. La nucléase protéique Cas9 s'associe à ce complexe crRNA-tracrRNA et induira la coupure de l'ADN au niveau de la séquence cible.

## 1.1.2. L'utilisation des NBT et des techniques d'édition du génome jusqu'en 2016

En 2016, de nombreuses études rapportaient déjà le développement de caractères agronomiques d'intérêt par désactivation ou activation de gènes à l'aide de SDNs chez des espèces cultivées (Sovová *et al.*, 2016 ; Rani *et al.*, 2016). L'introduction de ces approches dans des schémas de sélection était plus ou moins avancée (Nogué *et al.*, 2016) : la majorité des programmes étaient encore à des stades très précoces de preuve de concept (ou « POC » selon l'acronyme anglais de « Proof Of Concept »), d'autres aboutissaient déjà à des essais au champ, voire étaient en phase de production.

Parmi les applications agronomiques des éditions des génomes pour lesquelles des preuves de concept avaient déjà été produites en 2016, on comptait notamment des traits liés à la tolérance aux herbicides, des caractères innovants liés à la qualité nutritionnelle et à l'aptitude à la transformation, la tolérance aux maladies et l'augmentation de productivité des cultures (Gendre, 2016).

## 1.1.3. L'évolution des NBT et des techniques d'édition du génome depuis 2016

Les évolutions majeures des techniques d'édition du génome et de certaines NBT depuis 2016 sont synthétisées dans cette section. Cette synthèse permet de comprendre la suite du rapport. Les lecteurs désireux d'approfondir le sujet sont invités à lire l'annexe 2.

### 1.1.3.1. Augmentation du nombre de cibles potentielles

#### Grâce à la découverte de différents PAMs

Le PAM (Protospacer adjacent motif) est une courte séquence de nucléotides présente sur l'ADN cible et reconnue par la nucléase Cas. La coupure précise réalisée par la protéine dépend de la combinaison de deux événements consécutifs :

- la détection du motif PAM sur la séquence cible
- la reconnaissance analogique de la séquence de l'ARN guide qui lui est associée (Colias et Beisel, 2021).

Jusqu'alors, la faible diversité des séquences PAMs, associées à la Cas9, était un élément limitant dans l'édition du génome, par l'absence de motifs compatibles proches de la séquence ciblée. L'élargissement de la variabilité en motifs PAMs, grâce à la découverte de protéines Cas orthologues à la Cas9, permet un plus large éventail de séquences ciblées sur l'ADN (Camerlengo *et al.*, 2022, Chen *et al.*, 2019), rendant accessibles des parties du génome jusqu'alors inaccessibles pour réaliser des actions ciblées sur l'ADN.

#### Grâce à la création d'une Cas9 PAMless.

Les efforts réalisés pour élargir la gamme des motifs PAMs reconnus par le système CRISPR/Cas ont permis de lever des contraintes dans le spectre des séquences accessibles aux modifications ciblées. Cependant, une partie du génome demeure encore inaccessible, et ce, en raison de la position trop éloignée des motifs PAMs répertoriés. La question qui se pose alors est de savoir s'il est possible de se passer d'un motif PAM pour mener des actions ciblées sur l'ADN. Des études ont abouti à la conception de différents variants de Cas9, modifiant la séquence de reconnaissance d'origine, et permettant ainsi de rendre accessibles un plus grand nombre de séquences nucléotidiques (Walton *et al.*, 2020, Colias et Beisel, 2021).

Des efforts pour créer des sites de reconnaissance dits PAMless (moins spécifiques) sont en passe de rendre accessibles toutes les séquences du génome aux techniques d'édition. La

spécificité passerait alors seulement par la séquence d'ARN guide associée au complexe CRISPR/Cas. Des études doivent encore être menées pour affiner cette méthode (Tang, 2020), afin de gagner en spécificité et d'éviter les mutations hors cibles (off-target).

### 1.1.3.2. Edition et insertion choisies d'une ou plusieurs bases

La limite que représentait la séquence PAM dans les actions menées sur le génome est donc en passe d'être levée. L'accessibilité plus large à la modification ciblée est une vraie avancée qui s'additionne à d'autres évolutions, telles que les techniques de « *Base Editing* » et « *Prime Editing* ». Jusqu'alors, la mutagenèse dirigée laissait le « hasard » faire une erreur de réparation pour créer une mutation. Aujourd'hui, il est possible de choisir la base qui va remplacer une autre base. Plusieurs déclinaisons de cette méthode permettent de changer une base en une autre ou de faire des délétions ou insertions précises dans le génome.

#### Base Editing

Les méthodes de « *Base editing* » permettent la modification ciblée d'une base de l'ADN grâce aux systèmes nommés « **Cytosine Base Editor** » (CBE) et « **Adenine Base Editor** » (ABE). Leurs mécanismes généraux permettent la modification ciblée d'une base de C en T ou de A en G (Chen *et al.*, 2019, Zhu *et al.*, 2020 ; Das *et al.*, 2022). Pour aller plus loin, une méthode nommée **STEME** pour « *Saturated targeted endogenous mutagenesis editor* », a été développée afin de modifier deux bases de l'ADN simultanément. Pour ce faire, elle combine les deux systèmes (ABE et CBE) afin de modifier une cytosine en thymine et une adénine en guanine (Azameti *et al.*, 2021 ; Zhu *et al.*, 2020).

Les méthodes CBE, ABE et STEME permettent le remplacement d'une base purine avec une autre purine (Adénine et Guanine) et d'une pyrimidine avec une autre pyrimidine (Thymine et Cytosine), cela est appelé une transition. Des déclinaisons de ces méthodes permettent de réaliser des transversions, c'est-à-dire le remplacement d'une purine par une pyrimidine et inversement. Ces méthodes consistent à modifier une Cytosine en Guanine, « C-to-G Base Editors » (CGBE), (Azameti *et al.*, 2021) ou une Cytosine en Adénine, « Glycosylase Base Editors » (GBEs), (Zhao D. *et al.*, 2021).

La méthode AFID (APOBEC – Cas9 fusion induced deletion system) a été développée en s'inspirant du système CGBE pour réaliser de courtes délétions précises et ciblées du génome. La technique nécessite l'utilisation d'une Cas9 dite « active », capable de couper le double brin de l'ADN (DSB = Double-Strand Break). Additionné à cela, l'un des brins va se voir retirer la cytosine, qui va laisser une place vacante et être clivée par des enzymes spécifiques. Cela va induire une délétion précise de la séquence de l'ADN entre le site de la cytosine délétée et la zone clivée de la Cas9 et, sur l'autre brin, suppression des extrémités 5' de l'ADN incompatibles puis réparation (Wang *et al.*, 2020 ; Zhu *et al.*, 2020 ; Azameti *et al.*, 2021).

#### Prime Editing

Les techniques de « *Base Editing* » permettent la modification d'une ou deux paires de bases simultanément. La méthode de « *Prime Editing* » permet d'induire des insertions, des délétions et des transversions d'au moins 4 bases de l'ADN sans nécessiter de coupure double brin de l'ADN (Das *et al.*, 2022). Le principe général de cette méthode est la coupure ciblée d'un seul brin de l'ADN. La réparation de la molécule d'ADN, par de multiples étapes de ligature et de réparation, permet d'insérer, de modifier ou de déléter des bases sur l'ADN double brin (Zhu *et al.*, 2020). Cette méthode, utilisée à ce jour chez quelques espèces végétales (le blé, le riz, la pomme de terre), nécessite d'être testée sur d'autres espèces. Cependant, sa capacité à modifier de manière prédictible des séquences d'ADN en fait un outil prometteur pour l'édition du génome (Zhu *et al.*, 2020).

### 1.1.3.3. Régulation de l'expression des gènes

La première partie de ce rapport fait état des modifications précises et ciblées au niveau de gènes, permises par le système CRISPR/Cas, grâce à l'action de clivage et de recrutement d'une nucléase Cas9. Lorsque l'intérêt ne se porte plus sur une modification des gènes, mais au niveau des séquences régissant la régulation de leur expression, la stratégie change, mais les acteurs restent les mêmes. Ainsi, pour cette application du système CRISPR/Cas, l'utilisation d'une deadCas9 (dCas9) est privilégiée. Il s'agit d'une Cas 9 dite « inactive » dont les deux domaines de clivage sont mutés pour les inhiber. L'utilisation de la nucléase modifiée permet ainsi de ne plus couper mais de guider vers une séquence précise une fonction donnée. Elle va ainsi être utilisée comme plateforme de recrutement afin de mener des actions sur l'ADN grâce à sa fusion avec différentes enzymes impliquées dans la modification de l'ADN et de la chromatine.

#### Inhibition de l'expression d'un gène : CRISPR interference

Par sa seule présence, la dCas9 peut induire une interférence dans les processus transcriptionnels de l'ADN empêchant l'expression du gène ciblé. Par sa simple fixation sur le double brin, elle gêne l'accès des protéines fixatrices de l'ADN comme les facteurs de transcription (Larson *et al.*, 2013). Si elle est fusionnée à un répresseur tel que le Kruppel-associated Box (KRAB), cela amplifie la répression du gène ciblé. Cette action d'interférence à l'expression d'un gène par le complexe CRISPR/dCas9 est aussi appelée CRISPRi (CRISPR interference) (Adli, 2018).

#### Activation / amplification de l'expression d'un gène : CRISPR activator

A l'inverse, le CRISPRa (CRISPR activator) consiste à recruter des activateurs transcriptionnels afin de booster l'expression du gène ciblé. Le recrutement peut se faire avec un ou plusieurs effecteurs. L'accumulation de plusieurs activateurs transcriptionnels a montré une efficacité supérieure dans l'expression du gène ciblé par rapport à celle qui n'en utilisait qu'un (Adli, 2018).

#### Modification de l'épigénome

L'utilisation du système CRISPR/Cas comme plateforme de recrutement d'effecteurs permet d'agir sur la régulation de l'expression des gènes, en recrutant des facteurs de transcription, par exemple. Mais, qu'en est-il des marques épigénétiques ? Les marques épigénétiques sont des modifications chimiques des bases de l'ADN ou des histones qui n'altèrent pas le code génétique mais qui agissent sur l'expression des gènes. Elles se caractérisent par une méthylation de l'ADN ou une acétylation/ méthylation des histones. En recrutant des acteurs responsables de ces marques, il est possible d'agir sur l'épigénome, de façon précise.

##### - *Par la modification de la méthylation de l'ADN*

La déméthylation d'une région de l'ADN a pu être obtenue par CRISPR/Cas. Il a alors été observé une augmentation de l'expression de l'ARNm (ARN messenger) dans cette région (Adli, 2018 ; Chen *et al.*, 2019). A l'inverse, la formation d'une méthylation par CRISPR/Cas sur une séquence ciblée a provoqué une altération de l'expression des gènes (Adli, 2018). Cette altération s'est accompagnée de nombreux effets hors cibles (Adli, 2018).

##### - *Par la modification des histones*

Au-delà d'agir sur la méthylation de l'ADN, il est possible de travailler sur la condensation et la décondensation de l'ADN autour des histones, par l'acétylation et la méthylation des histones, qui vont agir sur les charges ioniques. Dans le noyau des cellules, le génome est sous forme de chromosomes, composés d'une forme compactée et organisée de l'ADN, que l'on nomme chromatine. La chromatine peut se trouver à la fois sous forme condensée ou sous forme décondensée. La chromatine condensée se nomme « hétérochromatine » et son état décondensé se nomme « euchromatine » (Liu *et al.*, 2020). La modification des charges ioniques, provoquée par l'acétylation et la méthylation se caractérise soit par un relâchement

de l'enroulement de l'ADN autour des histones, soit par sa condensation. Ainsi, plus les histones sont acétylées, plus la chromatine se décondense et inversement. L'euchromatine, par sa forme décondensée, permet l'accès de l'ADN aux processus transcriptionnels (Liu *et al.*, 2020). La méthylation des histones permet donc la répression ou l'activation de la transcription des gènes.

Diverses stratégies jouant sur la méthylation/déméthylation ou sur l'acétylation/désacétylation ont été développées, permettant la réduction locale de l'expression de gènes ciblés (Kearns *et al.* 2015), la ré-expression d'un gène silencieux, (Cano-Rodriguez *et al.*, 2016), une augmentation locale des acétylations des histones (Hilton *et al.*, 2015), ou la réduction de l'expression d'un gène (Kwon *et al.*, 2017).

L'un des défis futurs est de relier chaque marque épigénétique avec les régulations associées. Le complexe dCas9 associé à des modificateurs épigénétiques permet aujourd'hui d'être un outil dans la compréhension des phénomènes épigénétiques et donc de la régulation du génome. Toutefois, ce contrôle n'étant pas héréditaire pour les générations suivantes, cela limite son intérêt dans l'amélioration variétale.

#### 1.1.3.4. Modifications Multiplexes

Le principe de l'édition multiplexe consiste à produire et exprimer simultanément différents ARNs guides, dans les cellules de la plante hôte. Il existe plusieurs méthodes qualifiées de multiplexes. Elles peuvent être, dans leurs formes les plus « basiques », composées de plusieurs ARN guides avec leurs propres cassettes d'expression, que l'on va placer dans un ou plusieurs plasmides (Hsieh-feng et Yang, 2019 ; McCarty *et al.*, 2020), ou de façon plus complexe, obtenues par la construction d'un ARN guide, composé de séquences d'ARN guides séparées par des petites séquences répétées et reconnues par des nucléases. Lors de la transcription, ces sites sont clivés et les ARN guides sont libérés (Hsieh-Feng et Yang, 2019 ; Montecillo *et al.*, 2020 ; McCarty *et al.*, 2020 ; Das *et al.*, 2022).

L'édition multiplexe permet de créer des modifications à plusieurs endroits du génome, rendant possible la régulation de plusieurs gènes, la modification de plusieurs traits agronomiques et le contrôle des voies de régulation. Il s'agit d'un outil prometteur pour faciliter l'amélioration, la sélection des espèces agricoles, voire la domestication (Zhu *et al.*, 2020).

#### 1.1.3.5. Réarrangement chromosomique

Avec l'apparition de méthodes d'édition plus précises et robustes, des approches plus ambitieuses ont vu le jour concernant la recombinaison méiotique ou la réorganisation à grande échelle des chromosomes (Das *et al.*, 2022). La réorganisation des chromosomes peut être induite grâce à l'utilisation du système CRISPR/Cas. En effet, il a été observé que, lorsque deux coupures double brin sont réalisées sur le même chromosome simultanément, cela provoque une délétion ou une inversion. Si la coupure double brin se fait sur deux chromosomes distincts, cela peut provoquer une translocation (Das *et al.*, 2022). Une translocation est un transfert d'une partie d'un chromosome à un autre chromosome. Cette translocation s'effectue lors de la méiose entre deux chromosomes homologues (et/ou homéologues) par le processus de *Crossing Over* (CO).

##### Inversion de gènes sur un chromosome

L'inversion d'un gène sur un chromosome a été réalisée par l'équipe de Schmidt *et al.* (2020), sur *Arabidopsis*, en utilisant de façon synchronisée deux systèmes CRISPR/Cas9 dont les séquences cibles se trouvaient dans des régions intergéniques entourant la zone ciblée. Il s'agissait de rétablir une inversion datant de 5000 ans sur le chromosome 4, caractérisée par la présence d'une partie du centromère au milieu du bras court. En rétablissant sa position historique, cette équipe est parvenue à rétablir des *crossing-overs* dans cette région, qui étaient alors éteints par l'inversion historique (Schmidt *et al.*, 2020 ; Das *et al.*, 2022).

### Translocation d'une zone chromosomique

Une recherche menée en 2020 par Beying *et al.* a permis la translocation réciproque et « sur mesure » d'une partie du chromosome 1 avec le chromosome 2, ainsi que du chromosome 1 avec le chromosome 5 chez *Arabidopsis* (Das *et al.*, 2022). Le système CRISPR/Cas9 a été utilisé pour réaliser des coupes localisées sur deux chromosomes hétérologues. La restructuration contrôlée des génomes végétaux doit encore être testée sur des plantes d'intérêt agronomique, mais au vu des résultats obtenus, cette nouvelle voie a le potentiel de rétablir la recombinaison dans certaines portions du génome, (Beying *et al.*, 2020 ; Schmidt *et al.*, 2020). Elle peut également la bloquer, et pose la question de la compatibilité avec la sélection variétale.

#### 1.1.3.6. Obtention de plantes éditées sans phase intermédiaire de transgènèse

Du fait de législations contraignantes vis-à-vis de l'insertion d'ADN exogène dans les génomes des plantes, les scientifiques cherchent aujourd'hui à développer des méthodes permettant de s'en passer et ont pu s'en abstraire par l'utilisation du système CRISPR/Cas9 sous forme de Ribonucléoprotéine (RNP) (Zhang S. *et al.*, 2021). Cette construction, aussi efficace qu'un système utilisant un plasmide, présente une réelle diminution des effets hors cibles dans les cellules, du fait de sa dégradation rapide. Les Cas9-ARN-guide-RNPs peuvent cliver l'ADN cible directement après son insertion en outrepassant la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle dans la cellule (Laforest *et al.*, 2022). Plusieurs méthodes de livraison des RNP (permettant une édition dite ADN-free) ont été développées (Chen *et al.*, 2019 ; Adli, 2018).

Ainsi les RNPs peuvent être délivrées dans les cellules de la plante par différentes méthodes déjà existantes. Par exemple, la transfection des protoplastes (cellules dénuées de paroi cellulaire) est une méthode qui permet l'introduction d'un matériel génétique dans une cellule. Elle nécessite des phases de préparation des cellules, qui doivent être libérées de leur paroi, afin qu'elles soient perméables à l'introduction du complexe. La délivrance du système CRISPR/Cas-RNP se fait soit à l'aide d'une PEG-Ca<sup>2+</sup>-transfection (Polyéthylène-glycol – calcium) ou par électro-transfection. Les protoplastes transfectés sont ensuite mis en culture pour régénération, développant ainsi des cals puis des plantules. L'avantage de cette technique est qu'en passant directement par un protoplaste, toutes les cellules régénérées posséderont le génome modifié (Yue *et al.*, 2021 ; Chen *et al.*, 2019 ; Laforest *et al.*, 2022). L'inconvénient principal de cette méthode est la difficulté de régénérer des plantes fertiles à partir de protoplastes, avec de grandes différences de succès de régénération entre espèces.

Parmi les méthodes de délivrance des RNP, il est possible de citer la méthode de bombardement biolistique. Le principe s'appuie sur un bombardement à haute vitesse, par des particules d'or ou de tungstène enduites de biomolécules (Laforest et Nadakuduti, 2022) sur plusieurs types de tissus, tels que des embryons immatures, des disques de feuilles/tiges ou des cals. De nombreuses espèces, telles que le riz, le maïs, le blé et des *Brassica*, ont été éditées par le bombardement de particules d'or de 0.6µm enduites du complexe CRISPR/Cas-RNP (Zheng G. *et al.*, 2021). D'autres méthodes existent, telles que l'utilisation de zygotes auxquels sera transfecté le système CRISPR/Cas-RNP (Toda *et al.*, 2019 ; Zheng G. *et al.*, 2021).

#### 1.1.3.7. Délivrance du système CRISPR/Cas dans les plantes sans culture *in vitro*

La culture de tissus *in vitro* est un élément limitant majeur dans l'utilisation de la transgènèse et de l'édition du génome. Il est limitant par le nombre d'espèces compatibles, par le temps nécessaire et par l'efficacité du résultat obtenu. L'utilisation de réactifs moléculaires comme les régulateurs morphogéniques, qui permettent l'induction d'un programme de développement spécifique, est une voie prometteuse pour s'affranchir de la méthode de culture cellulaire (Maher *et al.*, 2020).



### Induction de novo du méristème

Le principe de cette technique est l'utilisation d'une plante génétiquement modifiée, lui conférant la capacité de surexprimer une Cas9. En parallèle, des cultures d'*Agrobacterium tumefaciens* portant des gènes de régulateurs morphogénétiques et une cassette d'ARN guides sont préparées et injectées sur la zone de la tige de la plante support que l'on aura coupée (Zhu *et al.* 2020). Les régulateurs morphogénétiques vont ainsi stimuler l'embryogénèse et permettre la formation de méristèmes néoformés qui seront également potentiellement mutés sur le gène cible. Ces méristèmes peuvent ensuite être séparés de la plante support et donner des plantules porteuses du génome édité après transfert sur un substrat. L'étude mettant en lumière l'intérêt de cette nouvelle technique pour fixer des mutations induites a constaté que parmi les plantules éditées, un certain nombre ne possédaient pas de transgène, ce qui permet d'éviter l'étape de séparation du transgène dans les générations suivantes. Ainsi, les plantules permettront, dans les prochaines étapes, la formation de fleurs et de graines porteuses des modifications ciblées (Maher *et al.* 2020). Cette nouvelle méthode de délivrance, développée chez le tabac, a également été testée sur des espèces dites « d'intérêt », notamment la pomme de terre, la tomate et la vigne, avec la formation de plantules éditées, rendant ainsi cette méthode viable et adaptable pour différentes espèces. Si elle fait ses preuves (l'élimination des transgènes suggérant une instabilité chromosomique), elle promet une accélération dans la production de nouvelles plantes éditées (Maher *et al.* 2020).

### Virus-induced heritable gene editing

Sur le même principe que la méthode d'induction *de novo* des méristèmes, cette technique nécessite, au préalable, la modification génétique de la plante support, afin qu'elle exprime la Cas 9. Cette étape réalisée, un autre facteur limitant doit être contourné pour permettre aux virus d'intégrer les cellules méristématiques. Pour cela, des ARN guides sont fusionnés avec des ARN mobiles et introduits dans l'ARN2 du virus du hochet du tabac (TRV : Tobacco rattle virus). Avec l'assistance d'un *Agrobacterium*, l'infiltration se fait dans les tissus somatiques de la plante. Les éléments mobiles optimisant la propagation systémique et dirigée du complexe dans la plante, le système peut ainsi atteindre les cellules germinales, permettant la transmission des mutations créées à la génération suivante. Cette méthode compte une haute efficacité de transmission de la mutation à la descendance (Zhu *et al.*, 2020 ; Laforest *et al.*, 2022). Il y a ensuite production de graines porteuses du génome édité puis mise en germination. L'utilisation d'un virus à ARN simple brin à polarité négative (SYNV : Sonchus Yellow Net Rhabdovirus) permet de délivrer un cargo plus grand ce qui permet de se passer d'une plante génétiquement modifiée pour exprimer le système CRISPR/Cas (Laforest *et al.*, 2022).

**En conclusion**, l'utilisation du système CRISPR/Cas a connu des évolutions fortes depuis 2016, date du dernier rapport du Comité Scientifique du CTPS sur le sujet, tant sur la technique elle-même que sur la méthode d'introduction de CRISPR/CAS dans les plantes :

#### Des évolutions sur la technique :

- La première évolution notable est l'élargissement de la variabilité en motifs **PAMs**, qui permet un plus large éventail de séquences ciblées sur l'ADN. Cette évolution s'est faite grâce à la découverte de protéines Cas orthologues ou homologues, et grâce à la création de variants permettant de s'approcher d'une Cas avec un motif PAM moins spécifique et limitant (**PAMless**).

- Les méthodes de **base editing** et de **prime editing** permettent d'induire des modifications ciblées et choisies, d'une ou plusieurs bases à la fois. La réelle évolution est la capacité de ces méthodes de « choisir la base » de façon précise, sans faire appel à une modification aléatoire lors de la réparation de l'ADN.

- L'utilisation d'une protéine Cas « inactive » permet d'utiliser son action de fixation précise dans le génome, comme plateforme recruteuse d'effecteurs. Elle donne ainsi la possibilité d'agir sur l'expression des gènes. Cette méthode permet également d'exercer une action sur l'**épigénome** en modifiant les marques épigénétiques. En agissant sur la condensation/décondensation de l'ADN, il y a modification de l'expression des gènes.

- La méthode **de modifications multiplexe** permet de cibler plusieurs séquences de l'ADN, et ce, de manière simultanée. Cela ouvre la possibilité de modifier en une seule action, plusieurs cibles, et ainsi d'agir sur les voies de régulation, d'augmenter le nombre de traits édités ou d'agir sur l'expression de plusieurs gènes ou de familles multigéniques.

- Enfin, parmi les évolutions en devenir, le système CRISPR/Cas permet de travailler sur le réarrangement chromosomique, par l'induction d'inversion ou de translocation chromosomiques. Il s'agit là d'une amorce à la compréhension plus fine des dynamiques observées à l'échelle du génome. L'application principale pour les sélectionneurs est la possibilité de « casser » des déséquilibres de liaison.

#### Des évolutions dans les méthodes d'introduction :

Des évolutions ont également vu le jour dans **les méthodes d'introduction du système CRISPR/Cas dans la plante**, ce qui permettrait d'éviter des contraintes réglementaires dans certains pays et de lever les dernières barrières techniques relatives aux espèces récalcitrantes.

- Pour éviter les contraintes réglementaires dans certains pays, il ne doit pas y avoir d'insertion d'ADN exogène. Pour cela, plusieurs méthodes consistant à utiliser le système CRISPR/Cas sous la forme d'une **Ribonucléoprotéine** ont été développées, permettant d'éviter l'utilisation d'un plasmide codant pour le complexe CRISPR/Cas9, et ainsi de diminuer le nombre de mutations hors cibles, grâce à son action éphémère.

- Pour lever les contraintes liées aux espèces récalcitrantes et à la lourdeur méthodologique de la culture *in-vitro*, deux méthodes ont été développées. Il s'agit d'une part, de **l'induction de novo du méristème**, consistant à injecter le système CRISPR/Cas dans une partie déléguée de la plante, et pour laquelle la régénération se fait directement sur la plante support, et d'autre part, du « **Virus-induced heritable gene editing** » consistant à utiliser de l'ADN viral et sa capacité de propagation systémique et dirigée du complexe dans la plante. Actuellement les techniques utilisées en création variétale font toutefois appel à une étape de transgénése avec insertion d'un fragment d'ADN exogène.

## 1.2. L'utilisation des techniques d'édition du génome à des fins d'amélioration variétale

Les évolutions techniques récentes, précédemment développées sur la base de la littérature scientifique mondiale, permettent d'avoir une visibilité sur les possibilités à venir. Afin de compléter cet état des lieux des possibilités qu'offre la méthode CRISPR/Cas, il est intéressant de considérer les applications agronomiques actuellement travaillées. Sur la base des publications référencées sur le site EU-SAGE (*European Sustainable Agriculture Through Genome Editing*) [1\*], les recherches réalisées ces dernières années mettant en application CRISPR/Cas9 sont majoritairement réalisées par la Chine et les Etats-Unis d'Amérique, avec un nombre d'espèces travaillées relativement restreint. Le riz et la tomate sont les plus représentées avec respectivement 49% et 24% des publications référencées (cf. figure 2). Certains caractères d'intérêts agronomiques se démarquent tels que le rendement, la qualité nutritionnelle/ qualité du produit et la résistance/tolérance aux stress biotiques (cf. figure 2 et annexe 3).

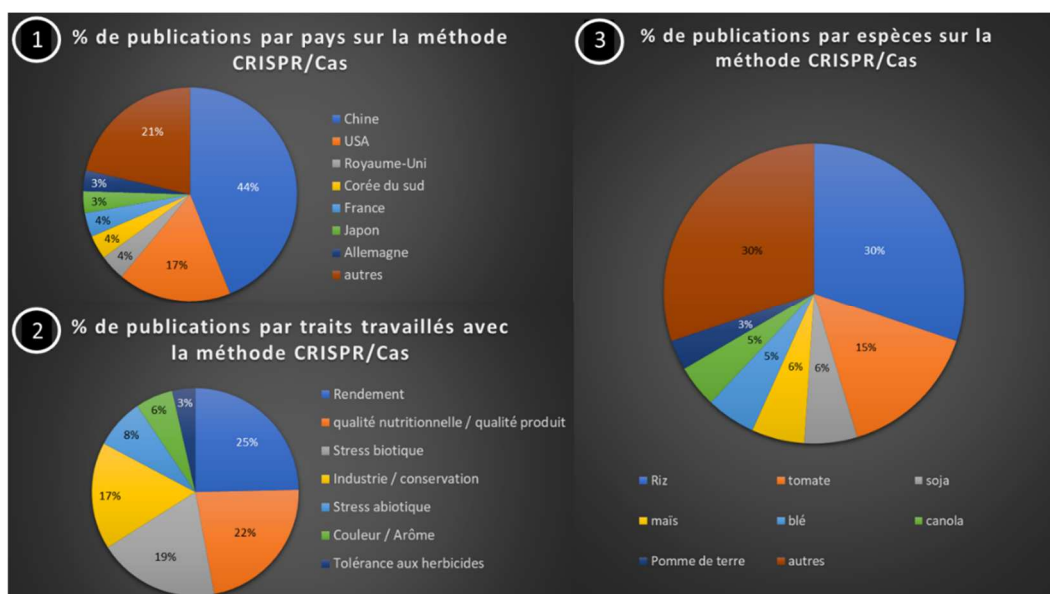


Figure 2 Pourcentage des publications référencées sur la base EU-SAGE : 1) par pays ; 2) par espèces et 3) et par traits travaillés par la méthode CRISPR/Cas. Les filtres utilisés prennent en compte les méthodes SDN1 ; SDN2 et SDN3.

Les applications du système CRISPR/Cas peuvent être multiples, pour répondre aux problématiques actuelles et aux enjeux de demain. Cette technologie de plus en plus fine et robuste est en passe d'ouvrir le champ des possibles et semble prometteuse face aux contraintes biotiques et abiotiques auxquelles est confrontée l'agriculture d'aujourd'hui. Le changement climatique est l'une des principales préoccupations de ce siècle, avec ses aléas, dont les phases de sécheresse sont de plus en plus longues, additionnées à une augmentation globale des températures. De plus, l'agriculture actuelle doit répondre à une impérative obligation de préserver l'environnement, qui pousse à réduire les intrants, qu'il s'agisse des fertilisants, source de pollutions des masses d'eau et d'émission de  $N_2O$  pour les engrais azotés, ou des pesticides afin de limiter, voire inverser, la baisse de la biodiversité provoquée en partie par la pollution des sols et des cours d'eau. En effet, un rapport réalisé par INRAE et IFREMER sur "*l'impact des produits phytopharmaceutiques sur la biodiversité et les services écosystémiques*" (2022) conclut que l'ensemble des milieux terrestres, aquatiques et marins sont contaminés par des produits phytopharmaceutiques, créant des impacts directs et indirects sur les écosystèmes [50\*]. Face à ces phénomènes, l'agriculture doit dès aujourd'hui trouver des stratégies pour assurer à la fois la quantité et la qualité technologique, sanitaire et nutritionnelle de ses productions, mais aussi la performance environnementale des systèmes de production agricole.

## 1.2.1. Rendement

L'agriculture mondiale doit répondre à des défis de transition multiple : transition alimentaire avec augmentation de la population, transition des régimes alimentaires, transition environnementale (restauration de la qualité de l'air, de l'eau et de la biodiversité), et enfin transition climatique avec augmentation des températures moyennes et des variations interannuelles. Le changement climatique provoque une réduction des rendements des cultures dans de nombreuses régions (Lobell *et al.*, 2012). L'évolution des systèmes agricoles reposant sur la diversification des cultures, sur le développement de cultures associées, ou encore des techniques nouvelles telles que le relay-cropping permet d'apporter une réponse pour augmenter la production par unité de surface tout au long d'une année. L'amélioration génétique est un levier pour maintenir ou augmenter le potentiel productif de chacune des espèces et variétés utilisées dans ces nouveaux systèmes. Parmi les méthodes d'amélioration génétique utilisables, et parce qu'elles permettent de disposer d'une diversité génétique nouvelle, les NBT pourraient contribuer à répondre à certains de ces enjeux en augmentant les rendements sans apport d'intrants polluants pour l'environnement.

*Augmentation des composantes du rendement* : Un des principaux traits développés par les NBT, en termes de rendement, est l'augmentation du nombre de grains par pied notamment chez le maïs, le riz et le colza. Par exemple, chez le riz, le rendement est déterminé par le nombre de panicules par plante, le nombre de grains par panicule et le poids et la taille des grains (Camerlengo *et al.*, 2022). L'extinction simultanée de trois gènes (GS3, GW2 et Gn1a) impliqués négativement dans ces trois catégories a permis d'augmenter le rendement chez trois cultivars (Zhou *et al.*, 2019). Chez un blé hexaploïde, l'extinction simultanée de trois gènes homéologues (*TaGW2*) a permis d'augmenter la taille du grain (largeur : + 10,9 % ; longueur : + 6,1 %) et le poids du grain (poids de mille grains : + 27,7 %) par rapport au cultivar de type sauvage (Wang W. *et al.*, 2018). Chez le colza, l'extinction de deux gènes (*BnaMAX1*) a permis l'augmentation des phénotypes ramifiés ainsi que le nombre de siliques par plante (Zheng *et al.*, 2020). L'ensemble de ces cas illustre l'existence de nombreux gènes régulateurs négatifs de composantes du rendement qui ont été sélectionnés positivement dans l'histoire évolutive des espèces avant leur domestication, car permettant de réduire des risques d'échec de reproduction. Le ciblage de tels mécanismes pour améliorer la productivité agricole a été postulé depuis plusieurs années (travaux de Denison & Sadras en particulier), et ces travaux confirment cette opportunité pour laquelle l'outil d'édition de génomes est particulièrement adapté.

*Optimisation de l'utilisation de l'azote* : les engrais azotés de synthèse ont été largement utilisés dans les pratiques agricoles afin de répondre à des demandes croissantes de rendement. Dans un contexte de réduction des intrants, l'amélioration par voie génétique de l'efficacité de l'utilisation de l'azote est un des leviers privilégiés dans les programmes de sélection. Dans le cas du riz, des mutants *are1* (*abnormal cytokinin response1 repressor1*) ont montré une augmentation de rendement dans des conditions d'azote limitantes. L'utilisation de NBT a permis l'étude fonctionnelle des gènes orthologues *ARE1* dans le génome hexaploïde du blé. Une équipe de chercheurs a réalisé des lignées mutantes, inactivant les trois gènes homéologues *TaARE1*, sur le blé d'hiver. Les lignées mutantes ont montré une tolérance accrue au déficit en azote et une augmentation significative des cellules corticales racinaires, dans des conditions hydroponiques. En conditions normales au champ, deux lignées mutantes présentaient une augmentation significative de l'efficacité d'utilisation de l'azote, une sénescence retardée et un rendement céréalier accru sans défaut de croissance par rapport au contrôle de type sauvage (Zhang J. *et al.*, 2021).

*Domestication de novo* : L'équipe de Zsögön *et al.* (2018) rapporte avoir obtenu la domestication *de novo* de *Solanum pimpinellifolium* sauvage, par l'édition simultanée de 6 gènes impliqués dans le rendement et la productivité. Il en résulte une augmentation de la taille et du nombre des fruits, ainsi qu'une augmentation du taux de lycopènes supérieur à celui obtenu par sélection de la tomate commerciale (Karavolias *et al.*, 2021). A travers ces nouvelles méthodes, la diversité génétique pourrait être rétablie, afin de retrouver « les traits bénéfiques des espèces sauvages, tels que la résistance aux maladies et la tolérance au stress, qui ont été perdues » (Zsögön *et al.*, 2018).

## 1.2.2. Modification de la composition et des propriétés nutritionnelles, organoleptiques et technologiques

La mauvaise qualité nutritionnelle de l'alimentation est aujourd'hui l'une des principales causes de décès dans le monde. Selon les derniers chiffres de l'OMS, en Europe près de 60 % des adultes et 30% des enfants sont en surpoids ou obèses [51\*]. L'apport en nutriments reste une priorité sanitaire : l'amélioration de la qualité nutritionnelle de l'alimentation apparaît comme un élément indispensable des systèmes alimentaires de demain. Cette amélioration nutritionnelle passe par une augmentation des molécules aux qualités nutritionnelles reconnues, ou par une diminution des molécules dites « anti-nutritionnelles » qui confèrent soit, un mauvais goût aux aliments, soit une toxicité reconnue. Il faut bien évidemment mesurer leurs effets sur les apports nutritionnels attendus ; il n'est pas question ici d'aliments mais d'aliments d'une meilleure qualité nutritionnelle.

### Augmentation des composés nutritionnels :

Le lycopène est un composé bioactif agissant dans la réduction des risques de cancer, dans la prévention des maladies cardiovasculaires et dans le traitement de certaines maladies chroniques. Une augmentation de la teneur en lycopène dans les tomates a pu être obtenue par l'extinction par édition de cinq gènes associés à la voie métabolique des caroténoïdes (Li X. *et al.*, 2018).

L'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) est un acide aminé non protéinogène, dont l'administration exogène chez l'homme et les animaux permet d'abaisser la pression artérielle. Ainsi, une consommation quotidienne d'aliments enrichis en GABA serait un moyen efficace de prévenir l'hypertension. C'est pourquoi de nombreuses études sont menées pour augmenter le taux de GABA dans les aliments les plus consommés dans le monde. Par exemple, chez la tomate, la mutation des régions codantes de deux gènes GAD (glutamate decarboxylase) par le système CRISPR/Cas9 a permis d'augmenter le taux de GABA dans les feuilles et les fruits à maturité (Nonaka *et al.*, 2017). Ainsi, une variété de tomate à forte teneur en GABA est d'ores et déjà commercialisée au Japon [59\*]. Chez le riz, la mutation C du côté 5' d'un gène a permis une augmentation par sept du taux de GABA dans le grain (Akama *et al.*, 2020).

L'acide oléique est un acide gras principalement utilisé dans l'industrie alimentaire pour ses propriétés gustatives et nutritionnelles. En effet, les huiles ayant un niveau élevé d'acide oléique sont nutritionnellement bénéfiques grâce à leur capacité à abaisser le taux de cholestérol et réduire la pression artérielle (Yuan *et al.*, 2019). L'acide oléique peut aussi être utilisé dans la chimie verte comme biolubrifiant, ester végétal et biocarburant [2\*]. Ainsi, le taux de l'acide oléique a été augmenté chez le colza, en créant des mutations dans le gène *fad2* (FAD2 : Fatty acid desaturase 2). Ces mutations ont également causé une diminution des teneurs en acide linoléique et linoléinique (Huang *et al.*, 2020). La teneur en acide oléique a également été augmentée chez l'arachide, par la mutation de deux gènes homologues codant pour l'enzyme FAD2 (Yuan *et al.*, 2019).

*Teneur en sucres des fruits* : Une équipe de chercheurs a permis d'augmenter la teneur en sucres de la fraise par édition du génome, en utilisant la méthode « base editing » (Xing *et al.*, 2020).

*Goût et arôme* : Une équipe de chercheurs a permis de créer un maïs aromatique grâce à l'extinction de deux gènes homologues au gène *osBADH2* (*ZmBADH2a* et *ZmBADH2b*) présent chez le riz. Son activité plus faible semble favoriser la biosynthèse de la 2-acétyl-1-pyrroline (2AP), qui est un composé aromatique volatil identifié dans le riz parfumé (Wang Y. *et al.*, 2021). Une autre équipe a réussi à créer des nouveaux allèles d'*OsBADH2* pour introduire de l'arôme dans toutes les variétés de riz non aromatiques par la méthode CRISPR/Cas9 (Ashokkumar *et al.*, 2020). L'équipe de Zhang (2022) a obtenu des lignées de sorgho avec une odeur aromatique dans les graines et les feuilles grâce à l'élimination de *SbBADH2* médiée par CRISPR/Cas9.

De nombreuses études sont en cours pour améliorer la saveur des fruits. Ainsi, la tomate et les fruits ont été particulièrement travaillés. Ces recherches se penchent sur les voies métaboliques des composés secondaires, pour en comprendre le fonctionnement. Il a été établi que ce « trait » était directement relié au processus de maturation du fruit, il dépend donc des hormones végétales, des facteurs de transcription (TF) et des modifications épigénétiques, qui peuvent tous influencer la qualité des fruits (Li *et al.*, 2022).

#### Diminution des molécules (facteurs) anti-nutritionnelles :

*L'acide phytique ou phytate* est un composé essentiellement localisé dans les graines jouant un rôle de stockage du phosphore. Sa consommation à haute dose, chez l'homme et les animaux, altère l'absorption des minéraux tels que le zinc, le fer, le magnésium, le calcium, le potassium, etc...par sa haute propension à les chélater. Dans les pays où l'alimentation est variée et équilibrée, il ne constitue pas de risque notable et montre même des propriétés antioxydantes et anticancérigènes. En revanche, lorsqu'une alimentation variée n'est pas possible, dans des conditions de faible disponibilité alimentaire et de faibles apports en minéraux, elle peut engendrer de fortes carences délétères pour la santé (Brouns, 2021). Des travaux visant à réduire sa teneur ont été réalisés, comme chez le colza dont l'extinction de trois gènes paralogues a permis de réduire la teneur en acide phytique et d'augmenter le taux de phosphore chez les mutants obtenus, sans affecter la croissance des graines et la teneur en huile (Sashidhar *et al.*, 2020 ; Camerlengo *et al.*, 2022). Chez le blé, l'extinction d'un gène d'Inositol Pentakisphosphate 2-Kinase a permis la diminution du taux d'acide phytique avec une multiplication par deux des taux de fer et de zinc (Ibrahim *et al.*, 2021 ; Camerlengo *et al.*, 2022).

*Réduction du taux d'acrylamide* en jouant sur le taux d'asparagine libre. L'acrylamide est une molécule produite naturellement chez les céréales, certaines légumineuses ou la pomme de terre, lors de certains traitements thermiques. La chaleur va provoquer la réaction de Maillard dont les principaux acteurs sont les sucres et des acides aminés. L'asparagine, plus particulièrement, serait un élément crucial dans la production d'acrylamide (Mottram *et al.*, 2002). La consommation importante d'acrylamide aurait des effets cancérigène et génotoxique chez les animaux de laboratoire et donc potentiellement chez l'homme. Ainsi, le JECFA (comité conjoint FAO/OMS sur les additifs alimentaires) a conclu que « des efforts devaient être déployés pour réduire l'exposition à cette substance » [3\*]. Un blé à teneur réduite en asparagine a été obtenu grâce à l'extinction du gène de l'asparagine synthase, par la méthode de multiplexage du système CRISPR/Cas9 (Raffan *et al.*, 2021). L'étude fait état d'une faible germination sur les graines éditées, ce qui pourrait être surmontée par l'application exogène d'asparagine (0.1 M dans l'eau) pulvérisée sur la surface du compost (Raffan *et al.*, 2021 ; Camerlengo *et al.*, 2022). Il n'est pas indiqué dans l'article si cette diminution permettait la diminution d'acrylamide *a posteriori*. Les mutants n'ayant pas été testés au champ, cette étude semble être au stade de la preuve de concept.

*La kafirine* est une protéine de stockage présente dans les graines de sorgho formant un corps protéique difficilement digestible. Sa composition, dépourvue de lysine, acide aminé essentiel, confère également une mauvaise qualité de protéines. Pour pallier cela, une étude visant à en réduire la teneur a permis d'obtenir, par l'action ciblée du système CRISPR/Cas9 sur le gène *k1C*, une augmentation significative de la qualité et de la digestibilité des protéines (Li A. *et al.*, 2018 ; Karavolias *et al.*, 2021).

*Le gluten* est un complexe protéique de stockage contenu dans les graines de blé, conférant des propriétés viscoélastiques aux aliments qui en contiennent. Il s'agit d'un complexe de protéines principalement composé de gliadine et de gluténine. Les gliadines sont responsables d'intolérances dans la population et sont associées au développement de la maladie cœliaque. L'équipe de Sánchez-León (2018), par extinction de gène codant pour l' $\alpha$ -gliadine, a permis de réduire la quantité d' $\alpha$ -gliadine dans les graines de blé dur et tendre (Sánchez-León *et al.*, 2018).

### Industrie et conservation

De nombreuses recherches sont menées à des fins non nutritionnelles. Un brunissement retardé, une couleur chatoyante, une qualité de fibre augmentée sont autant de facteurs qui peuvent être améliorés par les techniques de mutagenèse dirigée et apporter de vraies réponses pratiques aux limites industrielles et commerciales.

*L'amidon* est un polysaccharide utilisé dans de nombreuses industries selon les transformations qui lui sont appliquées. Ainsi, l'amidon natif (non transformé) est utilisé dans l'industrie alimentaire, pour ses propriétés liantes, texturantes, épaississantes, stabilisantes et gélifiantes. L'amidon transformé ou modifié, par une méthode chimique ou physique, est utilisé pour sa solubilité à froid, sa viscosité, sa stabilité à la décongélation, sa fluidité, etc... L'hydrolyse de l'amidon sert, quant à elle, à obtenir des produits sucrants tels que les sirops. Les produits amylicés se retrouvent dans la papeterie (couchage et glaçage du papier, couches culottes jetables), dans l'industrie pharmaceutique (enrobage de comprimés, agent dispersant, capsulage de gélules...), dans les cartons ondulés, dans la cosmétique, dans l'alimentaire et dans le textile pour ne citer qu'eux [4\*]. Des études visant à modifier le ratio amylopectine/amylose qui composent l'amidon ont été réalisées afin d'augmenter le taux d'amylopectine sans supprimer l'amylose. Pour ce faire, l'équipe de Andersson (2017) a obtenu une pomme de terre riche en amylopectine, par extinction des 4 allèles du locus *GBSSI* (granule-bound starch synthase) initialement impliqués dans la synthèse de l'amylose. Des pommes de terre riches en amylopectine ont déjà été obtenues auparavant, mais il s'agit ici de démontrer qu'il est possible d'obtenir ce résultat sans introduction d'ADN exogène (Andersson *et al.*, 2017). Sur la patate douce, l'équipe de Wang (2019) a permis, par extinction de 2 gènes de la voie de biosynthèse de l'amidon, l'augmentation du taux d'amylopectine (Wang *et al.*, 2019).

*Le processus de brunissement* des fruits est provoqué, en partie, par les polyphénols oxydases. Il s'agit d'un groupe d'enzymes dont l'action est influencée par des facteurs tels que le pH, la température et l'oxygène. Leur action se caractérise par un changement de couleur des fruits, provoqué par l'oxydation des composés phénoliques après la récolte et durant le stockage. Le brunissement des fruits et des légumes impacte leur qualité et représente un problème économique pour l'industrie alimentaire. Ainsi, chez l'aubergine, l'équipe de Maioli (2020) a permis une diminution de l'activité de Polyphénols oxydases (PPO) et du brunissement de la chair, par l'extinction de 3 gènes, sans réduire la teneur en composés phénoliques (Maioli *et al.*, 2020). Chez le champignon de Paris, l'extinction d'un gène lié aux PPO a permis d'induire un retardement du brunissement (Waltz., 2016). De plus, chez la pomme de terre, l'induction de mutation sur quatre allèles du gène *stPPO2* a permis la réduction de l'activité des PPO dans le tubercule avec une diminution du brunissement (González *et al.*, 2020).

*Couleur* : Un travail sur la couleur a été réalisé sur l'*Ipomoea nil*, dont la palette de couleurs de fleurs ne comprend pas la couleur jaune. Ainsi, l'équipe de Watanabe (2018) a permis d'obtenir des pétales jaunes par l'extinction du gène *InCCD4*, impliqué dans la dégradation des caroténoïdes dans les pétales, à l'aide du système CRISPR/Cas9. L'équipe de Nitaraska (2021) a obtenu des poinsettias avec des bractées orange par l'utilisation de la méthode CRISPR/Cas9 ciblant le flavonoïde 3'-hydroxylase (*F3'H*), responsable de la couleur rouge des bractées.

### 1.2.3. Résistance aux stress abiotiques

Les stress abiotiques se définissent comme des stress provoqués par des facteurs physiques. Derrière ce terme, se cachent divers facteurs, souvent liés au climat et/ou à l'activité humaine, qui peuvent notamment impacter les cultures agricoles. Le stress provoqué par le climat peut être par exemple de type hydrique ou thermique. Le stress hydrique se manifeste lors de déficit en eau. Le stress thermique peut être causé par de fortes températures ou des températures très basses, voire des gelées. L'activité humaine peut également engendrer la pollution atmosphérique (ozone) et du sol. Pour pallier les effets néfastes induits sur les cultures, différentes recherches sont en cours afin de trouver des solutions pour optimiser ou limiter la captation des éléments du sol, et ainsi assurer la qualité et la sécurité alimentaire.

#### 1.2.3.1. Résistance au stress hydrique

*Par la réduction du nombre de stomates* : en conditions de sécheresse, les plantes ferment leurs stomates afin de limiter la perte d'eau causée par l'évapotranspiration. Ce changement d'état provoque, d'une part, une augmentation de la température de la plante et, d'autre part, une réduction des échanges gazeux ( $\text{CO}_2$  et  $\text{O}_2$ ) réalisés au niveau des chambres stomatiques. Cela impacte la machinerie photosynthétique et la production d'énergie qui en découle. Le ralentissement métabolique lié à ces différents événements affecte le développement de la plante et se manifeste au champ par une perte de rendement (Korres *et al.*, 2017). Pour pallier cela, l'équipe de Yin (2017) a obtenu chez le riz la réduction du nombre de stomates sur la surface abaxiale des feuilles, par l'extinction d'un gène impliqué dans le développement stomatique. L'étude ne fait malheureusement pas état d'un développement en milieu stressé pouvant éclairer sur l'utilité de cette diminution dans la résistance à la sécheresse (Karavolias *et al.*, 2021). Toutefois, l'équipe de Caine (2018), en diminuant aussi la densité stomatique chez le riz par transgénèse classique, a montré que cette réduction permettait d'augmenter la tolérance à la sécheresse et que les plantes présentaient une meilleure conservation de leur eau, en conditions de stress hydrique sous hautes températures. De surcroît, le riz obtenu présentait des rendements équivalents voire améliorés dans des conditions de cultures bien hydratées. Toutefois, il a été observé une photosynthèse réduite et une augmentation de la température interne de la plante, dans des conditions optimales d'hydratation (Caine *et al.*, 2018).

*Par sensibilité réduite à l'éthylène* : L'éthylène est une phytohormone jouant un rôle dans la réponse des plantes aux stress abiotiques tels que la sécheresse et les hautes températures. Des études menées sur des maïs transgéniques ont montré que la réduction de la synthèse d'éthylène permettait d'augmenter le rendement en grains dans différentes conditions de stress hydrique (Shi *et al.*, 2017). Ainsi l'introduction d'un promoteur spécifique du gène ARGOS8, impliqué dans la régulation et la transduction du signal de l'éthylène, a permis une amélioration du rendement en grains en période de sécheresse, sans perte de rendement en l'absence de stress hydrique chez le maïs grain (Shi *et al.*, 2017 ; Karavolias *et al.*, 2021 ; Camerlengo *et al.*, 2022).

*L'acide abscissique (ABA)* est une phytohormone impliquée dans l'adaptation des plantes aux stress biotiques et abiotiques par une cascade de signalisation impliquant des récepteurs. La fonction de répression de la croissance par l'ABA était jusqu'ici considérée comme un



compromis pour améliorer l'adaptation au stress. Néanmoins, chez le riz, l'étude par mutation systématique des protéines PYL codant pour des récepteurs de l'ABA (13 gènes) a été permise par l'utilisation de NBTs. L'étude combinatoire de ces mutants a montré une différenciation fonctionnelle et des redondances offrant la possibilité d'ajuster l'équilibre entre la croissance et la résistance au stress afin d'améliorer la productivité des cultures par modification de certaines PYL (Miao *et al.*, 2018).

### 1.2.3.2. L'agriculture sur sols pollués

#### Faire pousser des plantes sur les sols pollués

De nombreuses régions du monde font face à la pollution des eaux (radioactivité, solvants, carburants, etc...), des sols (ex : friches industrielles et présence de métaux lourds) et de l'air (gaz). Ces différentes sources de pollution d'origine anthropique rendent certaines zones impropres à l'agriculture, par le stress qu'elles induisent aux plantes et par le risque qu'elles représentent d'être prélevées et stockées dans les parties consommables des plantes. Par exemple, la présence de métaux lourds dans l'alimentation humaine pose de sérieux problèmes de santé publique, du fait de leur toxicité. Pour pallier cela, des équipes de recherche tentent de trouver des solutions pour rétablir une culture plus saine sur un sol pollué.

*Tolérance à la salinité des sols* : La présence d'une forte concentration en sel dans les sols est une source de stress pour les plantes. L'absorption des ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> provoque une réduction de la croissance de la plante due aux effets osmotiques et aux déséquilibres ioniques que cela entraîne (García *et al.*, 2018). Ces sols salins, en constante augmentation, sont causés par divers facteurs tels que les changements climatiques, l'élévation du niveau de la mer, l'irrigation et plus largement des pratiques agronomiques non adaptées et la composition des sols (Kumar *et al.*, 2013). Il s'agit du stress abiotique le plus couramment rencontré chez le riz. Pour cela, des études sont menées pour augmenter leur tolérance en milieu salin. Ainsi, l'équipe de Zhang (2019) a amélioré la tolérance du riz en milieu concentré en sel, par extinction d'un gène associé à la sensibilité au sel sans altérer les caractères agronomiques dans des conditions normales (Zhang *et al.*, 2019).

*Cadmium* : Une étude a montré que le riz produit en Asie comptabilisait une concentration supérieure en cadmium (Cd) comparé à ceux produits dans les autres régions du monde tels que l'Europe, le Moyen-Orient et l'Amérique du Nord. Pourtant, 90% du riz consommé dans le monde est produit en Asie. Cette concentration présente dans les grains de riz est directement liée à la contamination des rizières. Les moyens déployés pour les dépolluer sont souvent coûteux et longs (Tang *et al.*, 2017). Aussi, le développement d'une lignée de riz capable de limiter l'accumulation de Cd dans ses grains serait une réponse adaptée aux problématiques environnementales et sanitaires que ce phénomène pose. L'extinction d'un gène impliqué dans le transport du cadmium, par la méthode CRISPR/Cas9, a permis de réduire l'accumulation du métal lourd dans les grains, sans impact significatif sur le rendement et les principaux caractères agronomiques (Tang *et al.*, 2017 ; Karavolias *et al.*, 2021 ; Chen *et al.*, 2019).

*Césium* : Sur le même principe, l'équipe de Nieves-Cordones (2017) a permis la production d'un riz cultivé sur le sol contaminé de Fukushima (contaminé aux isotopes <sup>137</sup>Cs), présentant une teneur réduite en césium (Cs) radioactif. L'obtention s'est faite grâce à l'inactivation du transporteur OsHAK1, impliqué dans la voie d'absorption et de translocation du Cs<sup>+</sup> chez le riz (Nieves-Cordones *et al.*, 2017).

*Arsenic* : L'équipe de Wang F.Z. (2017) a, quant à elle, amélioré la tolérance du riz sur un sol contaminé par l'arsenic (As), par extinction du facteur de transcription OsARM1. Cette étude

a permis de lever le voile sur les voies de régulation de l'absorption d'As et de son transport des racines vers les parties aériennes du riz. Cependant, d'autres études doivent être menées pour réduire sa concentration dans les grains de riz, pour ainsi diminuer le risque sanitaire que représente cet élément aux effets cancérigènes et toxiques (Wang F.Z. *et al.*, 2017).

#### [Faire pousser des plantes pour dépolluer les sols : la phytoremédiation](#)

La phytoremédiation est un terme désignant la dépollution des sols par les plantes, englobant diverses stratégies rencontrées chez les 500 espèces référencées comme possédant « un potentiel de phytoremédiation ». Ces stratégies sont la phyto-extraction, la phyto-stabilisation, la phyto-dégradation, ou le phyto-dessalement. Les bénéfices d'une dépollution des sols par les plantes sont, sans aucun doute, la capacité à rétablir la fertilité des sols, ce qui contraste avec les méthodes de dépollution classiques telles que l'excavation. Des études sont menées sur les espèces pour caractériser et identifier les déterminants génétiques impliqués dans les processus mobilisés lors des diverses stratégies susmentionnées (Saxena *et al.*, 2020). L'efficacité de la phytoremédiation repose sur les mécanismes sous-jacents à l'accumulation et à la tolérance des métaux, tels que l'absorption, la translocation et la désintoxication des métaux. Jusqu'à aujourd'hui, la littérature scientifique fait état de réels progrès dans le domaine des phytoremédiations par les méthodes de transgénèse, bien qu'ils aient été, pour la plupart, testés uniquement dans des conditions de laboratoire (Fasani *et al.*, 2018). En revanche, très peu de publications font état de l'utilisation de la méthode CRISPR/Cas dans les phytoremédiations, bien que de nombreux gènes impliqués dans les mécanismes d'intérêts soient documentés. Ainsi, il est possible que, dans les années à venir, une meilleure connaissance des génomes et le développement des méthodes CRISPR/Cas permettent de développer des plantes capables de dépolluer les sols de manière plus efficace. Une autre stratégie mobilisant l'édition des génomes pour la dépollution des sols pourrait reposer sur la modification des microorganismes permettant d'extraire et transformer les polluants du sol, mais avec une plus grande difficulté de maîtriser les risques environnementaux induits.

### 1.2.3.3. Tolérance à des températures élevées

Au cours de leur vie, les plantes peuvent être soumises à divers événements climatiques, dont la hausse des températures. Sous un stress provoqué par la chaleur, les plantes présentent, au niveau cellulaire, des dommages membranaires, une surproduction de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species) provoquant des dommages oxydatifs et des perturbations métaboliques (Yu *et al.*, 2019). L'équipe de Yu (2019), par extinction d'un gène régulateur négatif de la réponse au stress thermique (SIMAPK3), a obtenu chez la tomate, une plus grande tolérance à la chaleur que les plantes sauvages. Cela s'est caractérisé par une réduction des dommages des membranes cellulaires, une diminution de la surproduction de ROS et une amélioration des activités d'enzymes antioxydantes sous stress (Yu *et al.*, 2019).

Modifier la phénologie, en retardant la floraison ou en l'avancant, permet de lutter contre les contraintes liées au climat et permet d'étendre les cultures sous d'autres latitudes. Le soja, sous un climat chaud, voit son rendement réduit à cause d'une floraison et d'une maturation précoces. Une équipe de recherche (Cai *et al.*, 2020) a permis, par extinction de deux gènes, de retarder la floraison de 31 jours ce qui a eu pour conséquence une augmentation du nombre de gousses et de graines par plante (Camerlengo *et al.*, 2022).

### 1.2.4. Résistance aux stress biotiques

La résistance aux stress biotiques est l'un des principaux traits travaillés dans la recherche actuelle, mettant en application le système CRISPR/Cas (cf figure 2). Les acteurs de ce stress biotique sont pluriels ; qu'ils soient de nature végétale, entomologique, virale, bactérienne ou fongique, ils sont les principaux facteurs limitants dans la production agricole actuelle. Nombre

de produits phytosanitaires sont utilisés pour contrer leurs effets afin d'assurer une récolte saine, de qualité et suffisante. Du fait d'une volonté de protection de l'environnement et de l'évolution des connaissances et des méthodes d'évaluation, on observe que, depuis quelques années, de nombreux produits phytosanitaires sont retirés de la vente, du fait de leur écotoxicité ou de leurs effets négatifs sur la santé. Cette tendance est aujourd'hui accentuée par le Pacte Vert européen qui vise une diminution des intrants afin d'assurer une durabilité de nos systèmes de production. Pour cela, il faut trouver des solutions alternatives pour lutter efficacement contre les différents ravageurs auxquels sont soumises les cultures, tout en préservant les écosystèmes. L'amélioration génétique fait partie de ces solutions. La démarche de sélection variétale, pour apporter une résistance à un pathogène et/ou un ravageur, est ancienne, mais l'arrivée des NBT offre une nouvelle voie de création d'allèles de résistance à des bioagresseurs, pour trouver des solutions innovantes face à ces nouveaux enjeux, grâce notamment aux méthodes de multiplexage.

#### 1.2.4.1. Bactéries

La brûlure bactérienne du riz est une maladie causée par une protéobactérie nommée *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Il s'agit d'une bactérie utilisant un système de sécrétion de type III (T3SS) qui va injecter des protéines effectrices de nature virulente directement dans le cytoplasme de la cellule hôte (Coburn *et al.*, 2007) pour acquérir des nutriments et inhiber le système immunitaire de la plante hôte. La bactérie permet l'induction du gène OsSWEET13, qui code pour un transporteur du saccharose, afin de l'utiliser comme ressource (Zhou *et al.*, 2015). Ainsi, Jiang *et al.* (2013) avaient obtenu l'extinction du gène par la méthode CRISPR/Cas9 sans prouver l'effet résistant de la plante sur la bactérie, chez *Arabidopsis* et *Nicotiana benthamiana*. L'équipe de Zhou (2015) l'a prouvé par une autre méthode de mutagenèse. D'autres stratégies allant dans ce sens, avec la modification simultanée de promoteurs SWEET, chez des lignées de riz, ont permis d'obtenir une résistance à la bactérie (Oliva *et al.*, 2019).

#### 1.2.4.2. Champignons

La pyriculariose est une maladie fongique du riz provoquée par le champignon ascomycète *Magnaporthe oryzae*. Une étude a montré que l'application exogène d'acide abscissique (ABA) chez le riz réduisait le taux d'éthylène et provoquait une augmentation de la sensibilité à *M. oryzae* (Liu *et al.*, 2012). Ainsi, l'équipe de Wang F. (2016), en utilisant la méthode CRISPR/Cas9, a amélioré la résistance par l'extinction d'un gène, facteur de transcription des ERF (Ethylene Responsive Factor), sans impacter les principales caractéristiques agronomiques (Wang F. *et al.*, 2016 ; Camerlengo *et al.*, 2022). Un autre exemple de maladie fongique contournée par la méthode CRISPR/Cas9 a été réalisé chez la tomate par des mutations homozygotes qui ont induit une perte de fonction du gène (*mlo*) entraînant une résistance à l'oïdium, en moins de 10 mois (Nekrasov *et al.*, 2017). L'extinction de deux gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la molécule de faltarinol chez la tomate a permis de créer des lignées mutantes plus résistantes au champignon *Botrytis cinerea* (Jeon *et al.*, 2020).

#### 1.2.4.3. Virus

La maladie du tungro du riz (RTD : Rice Tungro Disease) est causée par l'association de deux virus, le virus sphérique du tungro du riz (RTSV : Rice tungro spherical virus) et le virus bacilliforme du tungro du riz (RTBV : Rice tungro bacilliform virus). Cette maladie virale, transmise par l'insecte cicadelle verte, provoque un retard de croissance et une coloration jaune des feuilles de riz. Le RTSV tient un rôle d'auxiliaire entre la cicadelle verte et le RTBV, en favorisant sa transmission tandis que le RTBV est, quant à lui, responsable du développement des symptômes dans la plante. Ainsi, il a été montré que la résistance naturelle des plantes face au RTSV, de nature récessive, était contrôlée par le gène *eIF4G* (translation

initiation factor 4 gamma gene). Une résistance au RTSV uniquement permettrait de réduire l'incidence de la maladie en champ du fait de son action « auxiliaire ». L'équipe de Macovei (2018) a obtenu, par des mutations ciblées de l'ADN, des plantes résistantes au RTSV présentant un rendement amélioré par rapport à la plante sauvage, dans des conditions en serre avec inoculation du virus (Macovei *et al.*, 2018).

Cette capacité nouvelle à créer de nouveaux allèles de résistances à des pathogènes ne doit toutefois pas faire oublier l'obligation de construction génétique et d'une étude des conditions de déploiement spatial et temporel et de gestion qui soient de nature à assurer leur durabilité. Leur contournement engendrerait une course technologique sans fin et sans pertinence.

### 1.2.5. Des améliorations multiples

L'intérêt du multiplexage pour améliorer plusieurs traits en même temps a été souligné dans différentes publications.

*Nutrition et résistance au stress biotique* : Chez le soja, l'utilisation du multiplexage par le système CRISPR/Cas, a permis d'augmenter le taux d'isoflavone et d'induire une résistance au virus de la mosaïque du soja (SMV) (Zhang P. *et al.*, 2020).

*Rendement et goût* : un riz a été généré grâce à l'édition simultanée de trois gènes homologues du cytochrome P450 et 1 gène OsBADH2, avec le système CRISPR/Cas9 (Usman *et al.*, 2020). Les cytochromes P450 (Cyt P450s) représentent la plus grande famille de protéines enzymatiques des plantes jouant un rôle important dans différentes voies biochimiques, métaboliques et sont impliqués dans la prolifération cellulaire. Par ces mutations ciblées et multiplexées, des chercheurs ont obtenu un rendement plus élevé avec un gain de saveur. Ainsi, la qualité et la quantité ont été améliorées (Usman *et al.*, 2020).

**En conclusion**, il ne semble pas y avoir à ce jour de révolution majeure, parmi les matériels édités commercialisés hors de l'Union européenne. Mais des approches plus novatrices sont en cours d'étude portant notamment sur les mécanismes de régulation.

Les techniques d'édition du génome peuvent permettre de rendre plus accessibles les principales cibles de sélection (qui sont en outre travaillées avec d'autres approches de création variétale : recombinaison post-croisement, mutagenèse non ciblée, transgénèse). La stratégie principale est d'obtenir, par mutagenèse dirigée, les effets obtenus par d'autres méthodes de mutation, l'essentiel des modifications proposées actuellement étant de type "Knockout", i.e. bloquant l'expression d'un gène. Les traits étudiés et obtenus par édition du génome sont encore à déterminisme simple, mais les perspectives d'innovation qu'offre le multiplexage dans le travail de traits plus complexes pourraient apporter de nouvelles réponses aux problématiques actuelles. Les applications de cette méthode nécessitent encore des ajustements mais l'éventail des possibilités qu'elle offre laisse présager de réelles avancées dans la création variétale.

## 2. L'évaluation des variétés issues de NBTs

### 2.1. Les services et disservices potentiels des variétés éditées

Les évolutions des techniques et les travaux scientifiques publiés sur les caractères agronomiques sont autant d'informations précieuses pour comprendre les attentes et les enjeux du secteur agricole vis-à-vis des NBTs. Afin de compléter cette analyse, les membres du Comité Scientifique du CTPS, qui souhaitaient identifier des caractères nouveaux et les services associés qui pourraient être spécifiques aux techniques d'édition du génome et qui pourraient répondre aux enjeux de la transition agroécologique et du pacte vert européen, ont travaillé sur 3 études de cas qui figurent en annexe 4. Les différentes sections du CTPS ont également été sollicitées afin qu'elles expriment leurs attentes vis-à-vis des NBTs en tant que techniques permettant d'apporter des réponses compatibles avec les enjeux du pacte vert, qu'elles identifient les disservices potentiels qui pourraient y être associés, et l'incidence sur le marché que pourrait avoir l'utilisation de ces nouvelles techniques.

#### 2.1.1. Les services attendus

##### 2.1.1.1. Une évolution des schémas de sélection

La rapidité et la précision d'action de la méthode CRISPR/Cas ont largement été soulignées. Le travail de précision est une des clés dans la création variétale qui permettrait de réduire la temporalité de sélection. En effet, dans les schémas de sélection « classiques », le transfert d'un caractère monogénique d'intérêt d'un génotype donneur à des lignées élites receveuses va nécessiter la mise en place de rétrocroisements (ou back-cross) par le sélectionneur, dans le but de créer une lignée descendante identique à la lignée élite, avec le caractère d'intérêt. [46\*]

L'intérêt des méthodes de création variétale par la technique CRISPR/Cas et, de manière plus large, des SDNs, réside dans la possibilité qu'elles offrent de s'affranchir des rétrocroisements, en introduisant directement le trait, par mutation précise (SDN1 et SDN2) ou par insertion d'un gène (cisgénèse ; SDN3), dans la variété élite.

Cette notion de rapidité s'entend en particulier pour des espèces hétérozygotes polyploïdes, comme la pomme de terre, dont le travail de sélection est difficile, notamment lors de la fixation des caractères à l'état homozygote (caractère à transmission récessive, gènes de sensibilité, etc...).

Les NBT permettraient également d'envisager des modifications ponctuelles de caractères défavorables dans des variétés déjà existantes ayant un intérêt agronomique et commercial avéré. Contrairement à l'utilisation des mécanismes de recombinaison (sélection conventionnelle), avec les NBTs, le caractère défavorable peut être ciblé.

Dans le cas des espèces annuelles, les variétés porteuses de caractères nouveaux peuvent être obtenues et caractérisées dans des délais de 1 à 2 ans, selon le caractère ciblé et le phénotypage nécessaire. Cela représenterait un gain de temps très significatif en comparaison des schémas de création conventionnels dans lesquels il faut environ 8 ans, voire plus chez les espèces pérennes, pour aboutir à une nouvelle variété.

### 2.1.1.2. Une utilisation accrue de la variabilité génétique des espèces apparentées

L'arrivée des nouvelles techniques d'amélioration des plantes laisse également entrevoir la possibilité d'utiliser de nouvelles ressources génétiques. Les NBT permettent de s'affranchir des difficultés liées aux croisements entre le matériel végétal élite et certaines ressources génétiques récalcitrantes, par exemple pour introduire de nouveaux allèles de résistance, et sont autant de pistes à explorer qui augurent une vraie évolution de l'offre variétale future.

### 2.1.1.3. Les NBT au service de l'agroécologie

Les résultats déjà disponibles pour la résistance aux stress abiotiques et biotiques s'inscrivent déjà, pour une partie d'entre eux, dans une logique de transition agroécologique. Est-il possible d'aller au-delà ?

Dans le pacte vert européen, il est très souvent évoqué le terme de « durabilité », qui se définit comme étant « un développement qui répond aux besoins du présent sans compromettre la capacité des générations futures à répondre aux leurs ». Par ce vocable, l'enjeu est de repenser l'agriculture d'aujourd'hui pour assurer la pérennité de demain. Comment les NBT peuvent-elles aider à y répondre ?

Sous réserve que l'on connaisse le déterminisme des caractères, la méthode CRISPR/Cas permettrait de rendre accessible à la modification des caractères plus complexes, ce qui permettrait de répondre plus efficacement aux attentes du pacte vert européen. Plus globalement, en réponse à la question des caractères qui devraient être travaillés pour y parvenir, ils sont en cohérence avec ceux développés internationalement et présentés dans la partie précédente. Toutefois, la résistance des variétés aux herbicides irait à l'encontre des objectifs de réduction des produits phytosanitaires.

Le développement de caractères agronomiques seuls ne peut pas être l'unique clé pour répondre à tous les enjeux et les objectifs posés, mais il s'agit d'un outil prometteur qui peut être l'un des leviers, pour relever les défis futurs.

Dans les objectifs de réduction des intrants, pour la nutrition des plantes, les NBT pourraient apporter des réponses concluantes par une meilleure captation des éléments nutritifs du sol, par le recrutement d'organismes symbiotiques, ou une assimilation plus efficace de ces éléments. Actuellement, des travaux sont en cours pour optimiser l'utilisation de l'azote par exemple (cf : Chapitre 1.2.1).

Pour répondre aux sécheresses répétées tout en limitant l'apport d'eau, l'une des pistes de travail serait de favoriser le développement de la biomasse racinaire par des caractères d'architecture et de déploiement dans l'espace du système racinaire. Cela permettrait de rendre les variétés moins demandeuses et plus tolérantes aux épisodes de stress hydrique. D'autres stratégies sont en cours pour répondre à cette problématique, comme la réduction du nombre de stomates ou la réduction de la sensibilité à l'éthylène (cf : chapitre 1.4.3.1).

L'un des points importants dans la transition agroécologique est la réduction des produits phytosanitaires (insecticides, herbicides, fongicides et bactéricides) dans les cultures. Pour ce faire, il peut être intéressant de renforcer les défenses de la plante elle-même. Les stratégies adoptées sont presque aussi multiples que le nombre d'agents pathogènes présents (cf : Chapitre 1.2.4). L'une des stratégies proposées serait d'exploiter les possibilités qu'offrent les composés secondaires organiques tels que les C.O.V.B (Composés organiques volatils biogéniques), pour favoriser la répulsion de certains insectes ravageurs. Une autre application proposée pour ces composés est, à l'inverse, de favoriser l'attraction des auxiliaires pour une régulation des ravageurs.

Parmi les préoccupations actuelles, la résurgence des adventices connues et l'émergence de plantes adventices sont apparues avec le recul de l'utilisation des produits phytosanitaires et

par le développement de résistances à ces produits dans les populations adventices. Les NBT pourraient permettre de travailler sur plusieurs leviers pour y remédier, en favorisant l'allélopathie (ensemble des interactions biochimiques des plantes avec les autres plantes), en développant des variétés plus compétitrices face aux adventices ou en ciblant des traits permettant aux variétés de s'adapter au désherbage mécanique (architecture aérienne, port foliaire, phénologie et enracinement compatibles avec l'utilisation de différents outils de désherbage) (Saisine du Comité Scientifique CTPS - Quelles variétés pour l'agroécologie ? 2021). Le développement d'une allélopathie négative pour les adventices permettrait de contrôler les espèces indésirables afin de réduire la compétition avec les plantes d'intérêt, et diminuer la pollution qu'elles créent dans la récolte afin de limiter les produits désherbants.

Toutefois, les traits listés ci-dessus nécessitent la connaissance des gènes et des caractères, qui sont, pour la plupart à déterminisme complexe. Cette meilleure connaissance, combinée au développement et à l'amélioration de la méthode de multiplexage pourrait, théoriquement, apporter une variabilité pouvant répondre à certains de ces enjeux.

## 2.1.2. Les disservices potentiels

Plusieurs typologies de disservices, que la culture de variétés NBT porteuses de caractères innovants pourraient induire, ont été identifiées.

### 2.1.2.1. Disservices intrinsèques aux traits modifiés

Ces disservices sont caractérisés par les impacts négatifs, directement liés au trait agronomique développé, ou à sa généralisation, sur la culture elle-même.

Par exemple, si les caractères développés permettent la sécrétion de composés secondaires (C.O.V.B. et sécrétion racinaire) à visées attractives ou répulsives, il est difficile d'anticiper les effets pluriels qu'ils pourraient provoquer à la culture elle-même. En effet, est-ce possible d'identifier tous les acteurs de la faune et la flore qui seront potentiellement recrutés par ces nouveaux composés ? L'attraction de symbiotes et/ou d'auxiliaires attendue ne risque-t-elle pas d'être, en partie, court-circuitée par l'attraction non intentionnelle d'organismes ravageurs ou pénalisants pour la plante ? Dans le cas contraire, les activités répulsives attendues par le trait développé, ne risquent-elles pas de repousser certains auxiliaires ?

Additionné à cela, le développement de traits dont l'efficacité serait avérée pourrait engendrer une homogénéité génétique, à l'intérieur d'une espèce cultivée, voire de plusieurs. Une telle homogénéité pourrait exposer les agriculteurs à un risque biotique ou abiotique, comme le cas historique de la sensibilité à l'helminthosporiose, associée à la stérilité cytoplasmique utilisée chez les hybrides de maïs (cytoplasme Texas). Un second risque, systémique, serait lié à l'adoption d'une variété, ou d'une espèce, ou d'un trait particulier introduit dans plusieurs espèces par une forte proportion d'agriculteurs, générant des impacts négatifs d'une spécialisation de la production. Ces impacts négatifs sont liés aux effets associés à une chute de la diversité cultivée et des régulations associées.

Au-delà de l'homogénéité génétique, c'est une homogénéisation et une simplification des systèmes de culture qui peut découler de l'utilisation de certaines innovations disruptives, avec des effets négatifs également sur la régulation des bioagresseurs ou de la biodiversité associée (voir par exemple Burger *et al.*, 2015). Quel impact pourrait provoquer cette homogénéisation sur les écosystèmes ? Pourrait-il y avoir un contournement ?

### 2.1.2.2. Disservices écosystémiques

Le deuxième grand type de disservice est lié à l'écosystème. Des disservices ont été listés pour les OGM en général, par Snow *et al.* 2005 (tableau 1).

Tableau 1 Liste des disservices écosystémiques liés aux OGM (Snow *et al.*, 2005)

| Process   | Potential ecological consequences   |
|---|---|
| Transgenic organisms persist without cultivation  | Transgenic organisms that are able to spread and maintain self-sustaining populations could disrupt biotic communities and ecosystems, leading to a loss of biological diversity.   |
| Transgenic organisms interbreed with related taxa | Incorporation of transgenes could result in greater invasiveness or loss of biodiversity, depending upon the amount of gene flow from generation to generation and the transgenic trait(s).   |
| Horizontal gene flow                              | The transfer of genes through nonsexual means is common in some microbes but rare in plants and animals. Ecological consequences would depend on amount of gene flow and the transgenic trait(s).   |
| Changes in viral disease                          | In transgenic virus-resistant organisms, recombination between viral transgenes and invading viruses could lead to increased virulence of a disease and undesirable effects on wild hosts in natural habitats.  |
| Nontarget and indirect effects                    | Loss of biodiversity, including species of conservation concern, may occur, as well as altered community or ecosystem function, including reduced biological pest control, reduced pollination, altered soil carbon and nitrogen cycling, and secondary pest outbreaks.                       |
| Evolution of resistance                           | Resistance to pesticides (including pesticide-producing plants) can lead to greater reliance on chemicals and other pest control methods that are damaging to the environment, including unregistered pesticides under emergency exemptions. This applies to insects, weeds, and other pests. |

*Note:* Note that few types of transgenic organisms have been released into the environment, and therefore few of the potential ecological consequences listed have been documented to date (see *Ecological effects of GEOs* for details).

Dans les cas d'une forte libération de composés à visées attractives ou répulsives de certains organismes (par exemple les C.O.V.B), le risque d'un déplacement des populations de certains bioagresseurs est tout à fait possible. Cela pourrait-il provoquer un déséquilibre et impacter la chaîne alimentaire et indirectement les parcelles et les espaces naturels ou semi-naturels alentour ?

Dans le cas d'un trait permettant une sécrétion racinaire, dont le but est le recrutement de microorganismes symbiotiques afin d'améliorer la captation de nutriments du sol, le risque est de provoquer un dysfonctionnement provoqué par un déséquilibre généré par cette sécrétion. Le but d'une captation plus efficace pour la culture ne doit pas se faire au détriment du reste. En effet, une meilleure captation des éléments nutritifs du sol pourrait provoquer une augmentation de leur consommation et donc une diminution de ces éléments disponibles au sol. La question qui se pose alors est de savoir si cela peut provoquer un disservice pour la culture suivante ? Cette monopolisation ne risque-t-elle pas de desservir les organismes qui consommaient ces éléments ?

Enfin, le dernier point de disservice écosystémique est le risque d'une fuite du trait dans la flore sauvage, sexuellement compatible avec la plante éditée. Le type de risque est ici directement dépendant des allèles édités. Pour le compartiment cultivé, cette fuite pourrait promouvoir certaines espèces adventices, voire en créer de nouvelles. Dans les espaces naturels, elle pourrait renforcer (ou diminuer) l'adaptation de certaines espèces, et ainsi affecter les équilibres trophiques entre espèces et altérer le fonctionnement des écosystèmes. Le risque de dissémination et de persistance d'une modification conférant un effet insecticide (Type protéine cristal BT) dans les espèces forestières pourrait affecter d'autres communautés d'insectes phytophages (Bauer *et al.*, 2020). De même, la dissémination d'une édition diminuant la teneur en lignine des arbres pourrait conduire à une plus grande sensibilité aux tempêtes (Xiu-Hua *et al.*, 2022).



### 2.1.2.3. Disservices liés à la santé/qualité/nutrition

Parmi les disservices envisagés par le développement de caractères innovants figure la possibilité de créer une toxicité, à court ou long terme, sur les hommes ou les animaux, que ce soit une toxicité par émanation, dans le cas des C.O.V.B., ou par ingestion dans le cas des autres organites produits. La toxicité peut être liée tant à l'utilisation du produit primaire que dans l'utilisation des co-produits, issus de transformations.

En outre, les effets hors cibles dans le génome des plantes peuvent-ils conduire à des risques pour la santé ?

## 2.1.3. Services et disservices : spécificités liées aux NBTs

Les caractères développés par les techniques de mutagenèse dirigée peuvent être divisés en deux catégories : les traits déjà variables au sein de l'espèce, qui vont s'inscrire dans une continuité de l'amélioration variétale et les traits qui vont apporter une variabilité nouvelle au sein de l'espèce, pouvant créer une rupture avec ce qui existe déjà.

### 2.1.3.1. Dans le cas d'un trait déjà variable au sein de l'espèce

Les traits agronomiques qui s'inscrivent dans une variabilité déjà existante au sein de l'espèce, qui répondent à une continuité de l'amélioration variétale et qui pourraient s'obtenir par différentes techniques de sélection ne sont pas considérés comme innovants agronomiquement parlant, la nouveauté résidant dans la technique employée. Dans ce cas de figure, les services ou disservices qu'ils peuvent apporter ne sont pas spécifiques à l'utilisation des NBT. Ils ne diffèrent pas des services ou disservices induits par des variétés classiques, pour un niveau de diffusion du trait équivalent à celui que l'on connaît déjà. Si les NBT entraînent une diffusion plus rapide ou plus large de traits issus de constructions génétiques plus complexes et qui n'auraient probablement pas connus une explosion rapide dans le paysage en sélection classique, ils sont susceptibles d'apporter des disservices liés à l'homogénéisation des cultures.

### 2.1.3.2. Dans le cas d'une variabilité nouvelle

Les NBT peuvent induire une variabilité nouvelle pouvant se manifester par des effets nouveaux, encore jamais observés par sélection classique, qui se caractériseraient par exemple par un taux de protéines très élevé, la libération de métabolites secondaires très exprimés, une résistance forte à un pathogène, etc... Comme décliné précédemment, une innovation disruptive pourra demander une évaluation des effets (positifs/négatifs) directs, mais aussi une évaluation plus systémique de l'impact d'une modification d'usage (nouvelles pratiques culturales) ou d'une généralisation de son utilisation (impact écosystémique, homogénéisation génétique du paysage par exemple). Bien qu'il soit difficile, à l'heure actuelle, de visualiser l'ensemble des caractères que pourraient apporter les NBTs, plusieurs points de vigilance seront à considérer dans l'évaluation et la mise sur le marché d'une nouvelle variété qui en serait issue.

Par ailleurs, les techniques utilisées et leur utilisation sur les différentes espèces végétales peuvent apporter des disservices spécifiques, indépendamment des caractères édités.

### 2.1.3.3. Du fait de la méthode d'édition utilisée

Du fait des méthodes de biologie moléculaire utilisées pour éditer la molécule d'ADN, ainsi que des méthodes permettant de régénérer des plantes modifiées (culture *in vitro* par exemple), les NBT peuvent générer des modifications non contrôlées du génome. Lors de l'édition, ces modifications hors cible ("Off Target") peuvent engendrer des modifications de l'expression de certains gènes (Aquino-Jarquín 2021 ; Li S. *et al.*, 2022 ; Lema 2022). De

même, les techniques de culture *in vitro* sont connues pour engendrer des modifications génétiques non désirées (mutations, recombinaisons, délétions / translocations chromosomiques ; (voir Bairu *et al.*, 2011 ; Ranghoo-Sanmukhiya *et al.*, 2021) ou des modifications épigénétiques (modification de l'expression de certaines régions génomiques, sans modification de la séquence de l'ADN (Ghosh *et al.*, 2021 ; Miguel et Marum, 2011 ; Camas *et al.*, 2014 ; Azizi *et al.*, 2020). Ces variations somaclonales peuvent avoir des effets forts sur l'expression génique, la morphogénèse et le phénotype ou sur l'adaptation des plantes régénérées. Les modifications de structure des chromosomes peuvent bloquer la recombinaison de portions chromosomiques lors de la méiose, voire rendre impossible les croisements du fait de ségrégations chromosomiques anormales. Les autres modifications auront des effets qui dépendent des gènes et fonctions physiologiques impactées, comme détaillé pour les effets directs et indirects. Notons que si ces variations ont, comme en général lors de mutations, des effets délétères attendus, ce sont aussi potentiellement des sources de variations utilisables en sélection (Rai, 2021).

Si les modifications liées à la manipulation des cellules sont généralement communes entre techniques OGM et NBT, avec les mêmes effets non contrôlés, les méthodes d'édition du génome, plus ciblées, ont des effets hors cible très réduits (Li J., *et al.* 2019).

#### 2.1.3.4. Du fait de l'accès à la technologie

La concentration de la sole agricole sur un nombre réduit de variétés et d'espèces se trouve *de facto* induit si seul un nombre limité d'espèces bénéficie des bénéfices agronomiques ou économiques liés à l'édition des génomes. Si le coût d'entrée technologique (connaissance précise du génome, capacité à régénérer) ou financier (coût des licences et de la réglementation) est trop élevé et ne peut donc être amorti que sur un nombre limité d'espèces majeures, alors cela pourrait impacter la diversification des cultures, et la diversité intraspécifique cultivée.

Si ce coût est élevé, la question de l'équité d'accès à la technologie va également se poser, pouvant conduire à exclure de l'accès à la technologie et au progrès une frange des agriculteurs. Ce risque est évoqué pour la France et l'Europe, mais il est plus grand encore pour les agricultures paysannes, à vocation vivrière, très largement répandue dans le monde (B. Bensaude-Vincent, comm pers).

## 2.2. Comment évaluer les variétés éditées lors de l'inscription ?

### 2.2.1. Rappel sur l'inscription des variétés

L'évaluation d'une variété pour son inscription au catalogue officiel des variétés se fait sur les épreuves de DHS (Distinction, Homogénéité, Stabilité), complétées pour les espèces agricoles et la vigne des épreuves de VATE (Valeur agronomique, technologique et environnementale).

Des épreuves de VATE ont été définies pour l'inscription des plantes agricoles (en usages de production ou de service) et la vigne. Ces expérimentations permettent de juger le potentiel de rendement, la valeur d'utilisation jugée par des analyses (teneur en protéines, en huile, ...) ou appréciée après des tests prédictifs de la qualité (micromaltage pour une orge brassicole, ...), le niveau de résistance à des bioagresseurs ou des accidents climatiques ainsi que la précocité de la variété. Ces épreuves VATE, pour lesquelles la nouvelle variété candidate doit apporter un plus par rapport aux variétés actuelles, sont un levier important d'orientation du progrès génétique.

Les études DHS permettent de vérifier que la variété est Distincte des variétés notoirement connues, Homogène et Stable, c'est à dire qu'elle conserve ses caractéristiques phénotypiques de génération en génération. Conduites avec des protocoles harmonisés au niveau européen, sur du matériel végétal fourni par le déposant, elles permettent d'acquérir une description de la variété qui permet de l'identifier. Cette description et le matériel végétal fourni sont à la base de la certification des semences et de la protection des droits de l'obteneur.

Au terme des essais, les conclusions sont transmises aux déposants de nouvelles variétés et au CTPS, pour instruction [5\*].

## 2.2.2. Evaluer les variétés selon leurs caractéristiques ou selon les méthodes d'obtention ?

Les variétés porteuses d'un trait déjà variable au sein de l'espèce, obtenues par mutagenèse dirigée, doivent-elles être soumises à une évaluation similaire aux variétés obtenues par des méthodes conventionnelles, ou doivent-elles être soumises à une évaluation supplémentaire, due à la technique d'obtention ?

Si le produit obtenu est l'élément clé de l'évaluation, alors rien ne semble justifier une évaluation différente des variétés obtenues par d'autres moyens d'obtention. *A contrario*, si le produit est évalué en fonction de son mode d'obtention, alors, il est important de définir les contours de son évaluation et de justifier ces contrôles. Pour ce faire, il est important de s'interroger sur les éléments de la méthode qui posent question.

### [Les conclusions du rapport de 2016 : évaluer les variétés éditées selon le trait](#)

En 2016, le Comité Scientifique du CTPS préconisait d'évaluer les variétés éditées par l'analyse des traits produits par rapport à l'offre variétale actuelle inscrite au catalogue plutôt que sur la méthode d'obtention des variétés, en particulier lorsque le trait édité ne possède pas ou peu de variabilité dans l'offre variétale actuelle. Une évaluation portée sur le trait et la variété produite plutôt que sur la méthode d'obtention permettrait alors une plus grande transparence demandée par les acteurs de la filière et les consommateurs sur les impacts environnementaux et de santé (positifs ou négatifs) des nouvelles obtentions végétales.

### [Pourquoi évaluer les variétés selon leur méthode d'obtention ?](#)

A la lecture d'articles d'opposants à l'application de biotechnologies sur les plantes à des fins de création variétale, les effets hors cibles semblent cristalliser une grande partie de l'attention et justifier, par leur simple présence, l'interdiction d'utiliser des NBTs. Pour étayer leurs propos, ils insistent sur le fait que les nouvelles techniques d'amélioration des plantes pourraient « causer des dommages non intentionnels à l'ADN » et que leurs récentes utilisations ne permettraient pas d'évaluer les risques, qu'ils soient environnementaux ou sur la santé, leur position s'attachant à faire appliquer un principe de précaution [6\*]. En effet, bien que la technique soit spécifique à une séquence, l'assemblage de nucléotides visés peut être complètement ou en partie similaire à d'autres endroits du génome, pouvant induire des coupures non ciblées. De ce fait, cela peut, dans certains cas, atteindre certaines fonctionnalités de la plante. Toutefois, comme développé en partie 1.1.3., il existe deux séquences de reconnaissance spécifiques dans le système CRISPR/Cas, la séquence PAM et l'ARN guide ; la méthode reste donc très spécifique. De nombreux travaux sont en cours pour améliorer l'édition du génome en améliorant la spécificité de la technologie (ALLEA ; 2020). Par ailleurs, les techniques de mutagenèse aléatoire réalisées par des composés mutagènes existent et les variétés qui en sont issues sont cultivées sur le sol français, sans que des effets hors cibles ne soient contrôlés [7\*].

Ces arguments portent donc sur la qualité de l'édition et l'absence de modifications hors site. Même si les techniques progressent, les méthodes de culture *in vitro* et les méthodes d'édition restent associées à des effets non contrôlés, comme listé précédemment (2.1.2.2), et passent souvent par l'utilisation d'OGM de façon transitoire. Une façon de répondre à ces oppositions, appelant à l'application du principe de précaution face à de nouvelles techniques génétiques, serait de s'assurer de l'absence de modifications hors-site. Les méthodes de contrôle de la qualité des modifications génétiques existent, et requièrent dans le cas des NBT un reséquençage du génome (voir par ex. Jin *et al.*, 2021). Elles pourraient faire l'objet d'une nouvelle norme de contrôle associée aux variétés issues d'ingénierie génétique, dans la phase DHS par exemple.

### La réglementation des NBT dans le monde, basée sur la méthode ou sur le produit final

Avec l'émergence des techniques de mutagenèse dirigée, et l'arrivée de variétés qui en découlent, les pays commencent à mettre en place des législations pour les encadrer. Si dans un premier temps beaucoup ont fait le choix d'une réglementation commune à celle des OGM, il semble qu'aujourd'hui la tendance aille vers une législation plus souple, propre aux NBTs, faisant le choix d'une évaluation sur le produit final plutôt que sur la technique.

**En Inde**, après avoir dans un premier temps classé les NBT dans la même réglementation que les OGM, le gouvernement a décidé le 30 mars 2022 d'exclure les NBT de la réglementation des OGM, dès lors qu'il n'y a pas l'introduction de gènes étrangers (SDN-1 ou SDN-2) [8\*][9\*]. De même, au **Japon**, un comité consultatif du ministère de la Santé a conclu en 2019 que les produits issus des nouvelles techniques d'édition du génome ne nécessitaient pas d'évaluations spécifiques, ni de dispositifs de sécurité, dans les cas où il n'y aurait pas d'introduction de gènes étrangers [13\*][17\*][10\*]. En 2019, **le gouvernement australien** s'était positionné en faveur d'une non-réglementation des nouvelles techniques d'édition du génome, lorsqu'il n'y a pas d'introduction d'un nouveau matériel génétique. Les techniques de modification du génome ont été classées en trois catégories, en fonction du produit final obtenu. Actuellement, le Food Standards Australia New Zealand (FSANZ) réétudie les définitions des aliments génétiquement modifiés notifiés dans « Le Code des normes alimentaires ». Ces définitions détermineront quels aliments doivent être soumis à une évaluation préalable, afin de prouver leur innocuité avant de pouvoir être vendus en Australie et en Nouvelle-Zélande [13\*][14\*]. **Le gouvernement du Canada** a fait le choix de ne pas changer sa réglementation avec l'arrivée des NBTs. Leur réglementation actuelle est fondée sur les caractéristiques du produit final et non de la technique utilisée pour l'obtenir. Seuls les produits « nouveaux », n'ayant pas d'équivalents homologues, sont soumis à des évaluations préalables à la mise sur le marché. Les végétaux issus de l'édition génomique classés parmi les végétaux à caractère nouveau (VCN) seront donc soumis au règlement associé à cette catégorie. Les évaluations se feront au cas par cas par l'agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) et le Bureau de la biosécurité végétale (BBV), qui réglementent l'introduction intentionnelle des VCN dans l'environnement [11\*][9\*][12\*]. Aux **Etats-Unis**, la mise à jour, en 2020, des règles SECURE (*Sustainable, Ecological, Consistent, Uniform, Responsible and Efficient*) relatives aux biotechnologies végétales a permis de statuer sur la réglementation à appliquer aux NBTs. L'évaluation d'une plante génétiquement éditée se fait sur les caractéristiques du produit final et non la méthode d'obtention [9\*][10\*]. **En Argentine**, le gouvernement a établi que toutes les cultures issues des techniques d'édition du génome devaient être évaluées au cas par cas. Une demande doit être faite auprès de la commission consultative nationale sur la biotechnologie agricole (CONABIA = *comisión nacional asesora de biotecnología agropecuaria*) afin de déterminer si un produit relève ou non de la résolution sur les OGM (résolution 701/11). Cette même approche se retrouve dans les pays tels que le Chili en 2017, la Colombie et le Brésil en 2018, puis le Paraguay en 2019. [15\*][13\*][16\*][10\*]. De nombreux pays, comme ceux de l'Union européenne, sont encore en cours de réflexion sur les règles à adopter.

### 2.2.3. Le système d'inscription actuel permet l'évaluation des traits édités

Au cours des discussions avec les acteurs des différentes filières, certains ont estimé qu'il conviendrait de mettre en place, lors de l'inscription, une évaluation particulière qui mettrait en comparaison les variétés issues de NBT à des variétés classiques du marché et à des témoins de référence. Avec le support de nouveaux protocoles et de méthodologies de phénotypage précis, cela permettrait de réaliser une bonne évaluation intrinsèque de ces variétés ainsi que de leurs effets (services/disservices) sur d'autres espèces/traits du mécanisme touché par l'édition. Cela nécessiterait un protocole d'inscription plus long et plus coûteux, afin d'évaluer plus précisément le comportement des variétés éditées et de valider leur intérêt sur le marché.

Cependant, les systèmes d'évaluation et d'inscription actuels semblent adaptés à l'évaluation agronomique de tous les modes d'obtention variétale, donc aux NBTs. Une évaluation supplémentaire ne semble pas nécessaire, dans le sens où l'édition génique n'est qu'un outil supplémentaire de création de variabilité et de progrès génétique. Par contre le système DHS et VATE n'est pas conçu pour évaluer les risques écosystémiques, ce qui est hors des missions actuelles du CTPS et demanderait une adaptation spécifique.

Le système d'inscription actuel semble adapté pour l'évaluation agronomique des variétés éditées. Ces dernières, comme les autres variétés, doivent s'intégrer dans un système de culture. Bien que les évolutions techniques laissent penser que les variétés éditées puissent potentiellement présenter une innovation plus forte que les variétés conventionnelles, elles ne constituent pas une nécessité de changement du système actuel. Le système d'inscription est suffisamment ouvert pour y répondre, notamment au moyen des expérimentations spéciales, dès lors qu'une allégation nouvelle est portée par le déposant. Le CTPS a montré par le passé sa capacité à assurer l'orientation du progrès génétique et à permettre l'apparition d'innovations significatives, pouvant devenir de nouveaux standards (tournesols oléiques, betteraves résistantes à la rhizomanie, ...).

Le CTPS est adapté à l'évaluation des traits des variétés en fonction des services ou disservices qu'elles apportent aux utilisateurs, et il a déjà largement fait ses preuves dans la capacité d'intégration de nouveaux enjeux et traits (cf. rapport de saisine « Quelles variétés pour l'agroécologie ? »). Une telle prise en charge par le CTPS, et plus largement par les offices européens en charge de l'inscription des variétés, permettrait que le processus d'évaluation s'appuie sur un dispositif existant, mature, lisible pour les utilisateurs, et unique. Pour ce faire, le CTPS devra faire évoluer ses règlements techniques ainsi que ses méthodes d'évaluation afin de s'adapter à l'offre nouvelle et être en mesure d'évaluer tous les traits issus d'édition du génome proposés à l'inscription, que cette édition touche les traits DHS ou VATE. Ces modifications inévitables dans les protocoles d'évaluation devront se faire en limitant les impacts sur les coûts d'inscription afin de ne pas pénaliser les déposants.

### 2.2.4. L'évaluation des caractères édités très impactants

Les variétés contenant de nouveaux traits, difficilement accessibles par sélection classique, ou présentant une gamme de variabilité significativement différente de la variabilité déjà existante, pourraient faire l'objet d'une attention particulière lors de leur inscription, du fait des potentiels disservices directs et indirects listés en section 2.1.

Un comité pourrait être chargé de statuer au cas par cas de ces nouvelles variétés.

Toutefois, la question se pose de savoir comment déterminer qu'une amélioration est « normale » ou « nouvelle », « peu » ou « très impactante » ? Comment déterminer le gradient ?

Faut-il imposer aux obtenteurs une transparence sur les disservices qu'ils pourraient percevoir lors de l'évaluation de leurs variétés ? Faut-il imaginer un comité d'évaluation des risques de disservices écosystémiques ? Faut-il aller jusqu'à une évaluation des risques comme cela est le cas pour les OGM ?

En effet, une évaluation des risques est demandée pour toute demande d'autorisation de mise sur le marché des OGM, dont les contours sont détaillés en annexe II de la directive 2001/18/CE. Dans la 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, les articles 4 et 13 précisent la nécessité de réaliser une évaluation des risques sur la santé humaine et l'environnement, avant toute autorisation de mise sur le marché et de dissémination volontaire aux champs d'OGM. L'annexe 2 en brosse les contours par le développement des notions d'effets directs et indirects liés à la dissémination volontaire des OGM ainsi que les notions d'effets immédiats, d'effets différés et même « d'effets cumulés à long terme ». Cette annexe fixe également les principes et la méthodologie applicables à l'évaluation des risques, le but étant de réaliser ces évaluations afin d'identifier et d'évaluer, au cas par cas, les effets négatifs potentiels des OGM pour décider s'il peut ou non être autorisé à la mise sur le marché et déterminer s'il est nécessaire de mettre en place une gestion des risques ainsi que les méthodes les plus appropriées pour ce faire. L'évaluation des risques est l'une des composantes de la notification adressée à l'autorité compétente de l'État membre où cet OGM sera mis sur le marché pour la première fois. Entre autres documents, il y est demandé un plan de surveillance conforme à l'annexe VII de la directive 2001/18/CE.

## 2.3. Suivi et évaluation des variétés après leur inscription

Les différents disservices qui ont été soulevés (chapitre 2.1.2) peuvent être une source d'inquiétude qui pourrait aboutir à la mise en place de surveillances, après l'inscription, comme c'est le cas pour les OGM présents dans l'Union européenne, ou par la mise en place de surveillances nouvelles.

La notion de surveillance pourrait s'appliquer aux caractères édités très modifiants, ou si la législation impose de suivre l'utilisation des variétés obtenues par NBTs. Les questions de propriété intellectuelle peuvent également amener à suivre la présence des gènes édités dans une espèce cultivée. Comme cela a été développé dans les chapitres précédents, il pourrait être nécessaire d'identifier les risques sur le compartiment cultivé de caractères édités disruptifs sur l'écosystème et de s'assurer de leur innocuité pour la sécurité alimentaire.

### 2.3.1. Importance de la surveillance

#### 2.3.1.1. La surveillance réalisée sur les OGM : rappel de la réglementation

Dans l'Union européenne, les demandes d'OGM et de denrées alimentaires (food) ou aliments pour animaux (feed) génétiquement modifiés doivent contenir un plan de surveillance qui fait partie de la décision d'autorisation. Plusieurs types de surveillance doivent être réalisés suivant l'application qui doit en être faite. Par exemple, pour toute demande de mise sur le marché d'OGM, le « plan de surveillance de l'environnement après commercialisation » (*PMEM : post-market environmental monitoring plan*) doit respecter les termes de l'annexe VII de la directive 2001/18/CE et comprendre une surveillance générale des effets indésirables imprévus et une surveillance spécifique qui correspond aux risques mis en évidence lors de l'évaluation des risques. En pratique, pour la culture, la surveillance générale comprend essentiellement un questionnaire aux agriculteurs et une revue bibliographique. La surveillance spécifique est liée, dans le cas du maïs BT, au risque d'apparition de résistance

chez les insectes cibles, et prévoit que le détenteur de l'autorisation doit faire des mesures relatives à cette résistance chaque année.

Concernant l'utilisation des aliments génétiquement modifiés pour la consommation humaine ou animale, un plan de surveillance post-commercialisation (PMM) supplémentaire peut être demandé si nécessaire afin de vérifier que les conditions d'utilisation sont correctement appliquées et surveiller la consommation du produit [18\*].

Ainsi, des plans de surveillance existent dès lors qu'un organisme génétiquement modifié est autorisé à la mise sur le marché. Actuellement, les NBT étant soumis à la même législation que les OGM, les plans de surveillance développés ci-dessus seront appliqués. Mais comme cela est précisé, l'évaluation des risques conditionne ensuite la surveillance spécifique. Les risques associés aux NBT seront potentiellement différents des OGM. Ainsi, il a été identifié plusieurs typologies de disservices (chapitre 2.1.2), que pourraient apporter des traits innovants et impactants, qui peuvent permettre d'identifier les surveillances à réaliser.

#### 2.3.1.2. Surveillances des NBTs

Comme cela a été précisé, les services et les disservices potentiels apportés par les variétés obtenues par NBT ont été soulignés par les membres du Comité Scientifique et par les sections du CTPS. Cela a permis d'identifier les points de vigilance pour certains traits qui s'avèreraient innovants et potentiellement impactants. Plusieurs types de surveillances ont été avancés pour répondre aux différentes typologies de disservices développées. Ainsi, il semblait important qu'une surveillance du compartiment sauvage, du compartiment cultivé et une surveillance alimentaire soient réalisées.

#### 2.3.1.3. Coûts et possibilités d'une surveillance des NBT

A la suite d'une demande de la Commission européenne, le groupe OGM de l'EFSA a réalisé une étude sur un ensemble de critères d'évaluation pour soutenir des réseaux adaptés à la surveillance générale des plantes génétiquement modifiées. Si certains ont été identifiés comme potentiellement adaptés pour la surveillance, en revanche certains ont montré leurs limites. Par exemple, il a été pointé du doigt l'accessibilité limitée aux données, le format de déclaration des données et la connectivité des données avec les registres d'OGM. Enfin, les experts ont également souligné dans leur rapport que la sensibilité des analyses statistiques utilisées par les programmes de surveillance était fondamentale pour détecter les changements de manière significative. Or, cela ne peut se faire que par une augmentation du nombre d'échantillons ou en combinant des ensembles de données collectées par différents réseaux de surveillance. La perspective de surcoûts que cela occasionnerait, additionnée à l'analyse de données plus complexe, due à un nombre de covariables plus importantes, permet de voir toute la difficulté de mettre en évidence des relations de cause à effet entre un OGM et un effet potentiel sur son environnement (EFSA GMO Panel, 2014). Un constat similaire a été fait sur les effets des produits phytopharmaceutiques appliqués aux cultures et peut servir de base de réflexion. En effet, l'expertise scientifique collective d'INRAE et de l'IFREMER réalisée sur « l'impact des produits phytopharmaceutiques sur la biodiversité et les services écosystémiques » (2022) souligne la difficulté de réaliser une expertise réaliste et pertinente sur les différents compartiments tant les facteurs impactants sont multiples.

### 2.3.2. La détection des variétés issues des NBTs

#### Le rapport de l'ENGL :

En 2018, la Cour de Justice de l'Union européenne (CJUE) a clarifié le statut juridique des produits issus de NBTs. Il découle de l'arrêt de la CJUE que les produits issus de NBT sont soumis à la réglementation des organismes génétiquement modifiés et donc aux mêmes obligations, notamment la traçabilité et l'étiquetage.

Pour appliquer cette réglementation, il est primordial de développer des méthodes de détection, d'identification et de quantification des NBT afin d'assurer leur traçabilité, pour le libre choix des consommateurs entre les différentes techniques agricoles et le fonctionnement du marché interne à l'Union européenne.

Pour cela, le laboratoire de référence de l'UE pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés (EURL GMFF : *EU Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed*), entité sous la direction du Centre commun de recherche de la Commission européenne (JRC : *Joint Research Centre*), a été mandaté pour évaluer et valider les méthodes de détections des OGM et des NBTs. Pour l'assister dans cette mission, il a fait appel au Réseau européen des laboratoires d'OGM, l'ENGL (European Network of GMO Laboratories).

L'ENGL a publié en 2019 un rapport sur les méthodes de détection de produits végétaux destinés à l'alimentation humaine et animale obtenus par de nouvelles techniques de mutagenèse. Pour ce faire, ils ont balayé les méthodes développées dans la littérature scientifique en les confrontant aux exigences de performance minimale attendues pour la validation des méthodes de détection. Différentes méthodes de séquençage capables d'identifier et de quantifier le matériel présent ont été explorées, parmi lesquelles la PCR quantitative (qPCR), la PCR digitale (dPCR) et les NGS (Next Generation Sequencing = Séquençage de nouvelle génération).

- La qPCR est une technique d'amplification génique *in vitro*, qui permet d'augmenter la quantité d'une séquence d'ADN ciblée grâce à la présence de deux amorces qui vont la borner précisément [20\*]. Additionné à cela, une sonde (par exemple : TaqMan) est ajoutée, augmentant la spécificité de cette méthode par sa structure, composée d'un oligonucléotide spécifique à la séquence ciblée, d'un fluorochrome et d'un désactivateur. L'hybridation de la sonde et son hydrolyse libère le fluorochrome créant une émission fluorescente, qui permet la quantification.
- La PCR digitale (dPCR) est une méthode proche de la méthode de PCR quantitative, par son mix réactionnel, ses amorces et ses sondes (TaqMan). En revanche, elle se démarque par une étape supplémentaire en amont de l'amplification, qui consiste en une partition de l'échantillon à analyser dans des micro-compartiments (ou gouttelettes). Le résultat obtenu se lit de façon binaire dans chaque compartiment, par un signal positif ou négatif. Des évolutions récentes permettent désormais des analyses en multiplex ouvrant ainsi la possibilité de détecter plusieurs altérations génétiques en une seule analyse [21\*].
- Les NGS (Next Generation Sequencing) sont des méthodes de séquençage à haut débit du matériel génétique qui englobe, sous ce vocable, différentes technologies de séquençage moderne comme Illumina® (Solexa), Roche 454, Ion torrent : Proton / PGM et SOLiD [22\*]. Elles sont, par exemple, utilisées dans la détection des cancers grâce à leur capacité de séquençage rapide du génome.

Selon l'ENGL, ces méthodes pourraient être utilisées dans la détection simultanée de plusieurs événements issus de la mutagenèse [23\*].

La difficulté majeure, dans la détection des NBT (SDN1 et SDN2), est la nature même des modifications, qui touchent soit un seul nucléotide ou se caractérisent par une séquence insérée ou délétée (Indels), ce qui est observable aussi avec les mutations naturelles. Au vu de cette variabilité génétique issue de processus biologiques, le point sensible n'est pas tant



la détection d'une altération de l'ADN, que l'origine même de la modification. En effet, il est techniquement possible de détecter des altérations spécifiques de l'ADN, sans connaître les modifications ultérieurement, mais aucune des techniques citées ci-dessus ne permet de déterminer si la modification est causée par la méthode d'édition ou non. Le manque de spécificité des modifications liées à l'édition du génome, contrairement aux OGM, qui peuvent être détectés par la présence de l'insert et des jonctions de part et d'autre de la séquence exogène, fait de sa détection une impasse.

Dans sa conclusion, l'ENGL constate que, parmi les méthodes de détection, d'identification et de quantification couramment utilisées pour les OGM, les résultats obtenus pour les NBT (SDN1 et SDN2) ne sont pas concluants pour établir avec certitude et sans ambiguïté, l'origine éditée des produits contrôlés.

Le rapport conclut qu'en l'absence de connaissances préalables sur les altérations potentielles du génome d'une plante, leur détection et leur identification ne semblent pas réalisables en utilisant des méthodes de détection appliquées en routine. Plusieurs problèmes concernant la détection, l'identification et la quantification des produits modifiés du génome ne peuvent pas être résolus à l'heure actuelle, par exemple en raison d'un manque de vérification expérimentale, et nécessiteront un examen plus approfondi. Il suggère que des technologies différentes des méthodes de détection couramment utilisées soient implémentées par des ressources additionnelles et nécessitent la mise en place de travaux supplémentaires. La possibilité de valider des méthodes de détection conformes aux exigences de performances minimales et de spécificité attendues pour valider la méthode nécessite également un examen plus approfondi.

Toutefois, dès que l'on s'intéresse à des éditions décrites, ce qui pourrait être le cas lors de l'inscription (par le biais du brevet par exemple, ou d'une demande de déclaration spécifique), les méthodes précédemment listées sont mobilisables pour un suivi, et efficaces.

D'autres pistes ont été proposées pour identifier des variétés issues de mutagenèse dirigée, en s'appuyant sur les traces hors-cible laissées dans le génome pour les détecter. Bertheau (2022) propose ainsi d'utiliser ces « signatures » génétiques et épigénétiques issues de variations somaclonales pour détecter les variétés éditées. L'efficacité de ces approches restent à explorer.

#### 2.3.2.1. La définition de seuils

L'édification de seuils a été mise en place pour permettre une coexistence entre les différentes agricultures (avec et sans OGM). Elle est possible grâce à la détection et la quantification des transgènes. Leur quantification permet de déterminer des seuils de présence fortuite d'OGM. Il est également possible grâce à la détectabilité de veiller au respect des normes appliquées en Europe par la mise en place de contrôles des produits à risques lors de leur importation. Ainsi, la définition de seuils est possible uniquement si les méthodes de détection spécifique et de quantification fiable existent, ce qui n'est pas le cas actuellement pour les NBTs. En effet, il pourrait être possible d'avoir des méthodes de détection pour les produits issus de NBT déclarés (mutation connue) mais la spécificité et la sensibilité des méthodes ne sont pas garanties actuellement. Il serait donc envisageable de vérifier si un produit "pur" (par exemple une variété) correspond à une modification connue NBT, mais cela semble plus difficile pour la détection de présences fortuites et la vérification du respect d'un seuil. Ces constats reposent sur l'utilisation actuelle des outils de PCR quantitative principalement utilisés sur les produits alimentaires. Les techniques de détection évoluent vite, et de nouvelles méthodes permettront certainement de suivre précisément les NBT (voir par ex. Pekin *et al.*, 2011, Peng *et al.*, 2020).

### 2.3.3. Importance de la traçabilité

En l'absence de méthodes de détection suffisamment spécifiques et sensibles, il est difficile d'envisager une séparation des différentes filières agricoles existantes. Du fait de cette impossibilité et dans un souci de faire coexister différentes agricultures, faut-il mettre en place une obligation de divulgation des techniques de sélection utilisées afin de garantir le libre choix des agriculteurs et des consommateurs ? Faut-il mettre en place une traçabilité et un étiquetage sur toute la chaîne de production ?

Pour pallier le manque méthodologique de détection et dans un souci de faire coexister différentes agricultures, la question de la traçabilité se pose, à savoir, faut-il imposer une transparence sur la méthode d'obtention des traits contenus dans les nouvelles variétés afin d'assurer un suivi sur toute la chaîne de production ?

Lorsqu'il y a évocation de coexistence, cela implique la mise en place d'une traçabilité, d'autant plus quand le produit obtenu est issu de techniques « non détectables » et « indissociables » des méthodes classiques de sélection. Cette traçabilité implique toute la chaîne de production, de son obtention à sa mise sur le marché. Cela nécessite une information transparente de tous les acteurs, en commençant par l'information de l'obteneur, qui, lors de l'inscription de sa variété, serait dans l'obligation de divulguer la méthode d'obtention des traits portés par sa variété. Dans cette hypothèse, l'information devra être suivie de l'agriculteur au consommateur.

Comme cela a été évoqué dans le rapport de saisine de 2016, l'arrivée des NBT pose des questions sur la non-déclaration de la technique lors de l'inscription de la variété. En effet, dans le cadre d'une dissimulation de la méthode par les obtenteurs, comment assurer le respect d'une traçabilité lorsque la détection n'est pas possible ? Avoir une suspicion de fraude sans moyens de vérification rend l'obligation d'information difficilement applicable. Surtout si la réglementation appliquée aux NBT est trop restrictive ou contraignante, ou si l'application de la technique n'arrive pas à être acceptée par le consommateur. Il avait été identifié trois cas de figures de cette dissimulation (Gendre, 2016), qui pouvaient constituer un risque pour les obtenteurs-dissimulateurs de voir leurs « créations » appropriées par des concurrents, grâce à l'exemption du sélectionneur.

**En conclusion**, les nouvelles techniques d'amélioration des plantes sont des outils prometteurs, dont on ne cerne pas encore toutes les possibilités sur l'offre variétale. Actuellement, ces outils n'ont encore développé qu'une faible gamme des applications possibles en création variétale. La possibilité de voir des caractères plus complexes accessibles aux modifications ciblées laisse présager des évolutions dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques. Pour les traits et voies métaboliques qui bénéficient de connaissances scientifiques approfondies, la promesse d'une accélération des schémas de sélection dans les filières agricoles en fait un outil intéressant pour répondre plus rapidement aux attentes agronomiques, sociétales, industrielles et écologiques. Les services et disservices apportés par les traits agronomiques qui s'inscrivent dans une variabilité déjà existante au sein de l'espèce, et qui pourraient s'obtenir par différentes techniques de sélection, ne sont pas spécifiques à l'utilisation des NBTs. Les NBT offrent un potentiel intéressant pour contribuer à la durabilité de l'agriculture via une innovation accélérée et des traits plus accessibles. Toutefois, l'utilisation massive des NBT pourrait potentiellement conduire au déploiement rapide d'un trait sur un territoire, avec éventuellement une réduction du nombre d'espèces cultivées car éditées, et induire des risques liés à l'homogénéisation de certains caractères (contournement des résistances, fragilité de l'écosystème...). Les NBT permettent également la création d'une variabilité nouvelle pouvant se manifester par des effets nouveaux, encore jamais obtenus par sélection classique, qui se caractériseraient par exemple par un taux de protéines très élevé, la libération de métabolites secondaires très exprimés, une résistance forte à un agent pathogène. Ces innovations disruptives, qui peuvent apporter des solutions à des contraintes majeures, peuvent en revanche être associées à des disservices qu'il convient d'évaluer. Enfin, les approches "gène-centré", souvent utilisées dans une logique de résolution de problèmes ciblés, ne sont généralement pas en phase avec la nécessaire amélioration d'un système de production et l'évaluation systémique et multi-caractères des innovations pour la transition agroécologique. Elles devront être combinées entre elles, ainsi qu'à d'autres leviers pour être pertinentes. Et pour être combinées, les éditions proposées devront rester compatibles avec la sélection variétale. Des modifications majeures des structures chromosomiques ou du fonctionnement cellulaire pourraient en effet rendre les croisements difficiles/impossibles avec les ressources travaillées parallèlement en sélection variétale. Vu l'importance pour la création variétale de l'utilisation en croisement des variétés nouvellement inscrites, de telles incompatibilités génétiques pourraient constituer des barrières biologiques à l'exemption du sélectionneur.

L'utilisation des techniques d'édition du génome ne remet pas en cause les principes majeurs de l'évaluation des variétés en vue de leur inscription. Si le produit est l'objet du contrôle, le CTPS est le dispositif le plus adapté à l'évaluation des traits des variétés en fonction des services qu'elles apportent aux utilisateurs, et il a déjà largement fait ses preuves dans la capacité d'intégration de nouveaux enjeux et traits. Toutefois l'évaluation des risques de disservices potentiels, telle que déployée sur les OGM, n'est pas portée par le CTPS et devra être considérée dans le cas de modifications disruptives. Ainsi il faudra veiller à faire une distinction entre les caractères édités : un caractère semblable ou proche de ce qui peut être obtenu par la sélection conventionnelle, ou un caractère nouveau très modifiant, afin d'adapter les règles applicables. Dans le cas de création de caractères totalement disruptifs et potentiellement très impactants, il conviendra de bien caractériser les services qui pourraient être rendus et d'être transparent sur les disservices qui pourraient apparaître. Il faudra également veiller à regarder les impacts sur la culture et l'environnement de traits nouveaux, et analyser les fuites éventuelles dans l'environnement de traits disruptifs (risque d'un passage à large échelle). Si la technique est soumise à des règles spécifiques, il faudra mettre en place des procédures d'évaluation préalable, de traçabilité et de surveillance après l'inscription des variétés.

## 3 Incidence de la mise en marché de variétés issues des NBTs

### 3.1. Coexistence entre les variétés éditées et les autres variétés

La coexistence se définit comme l'existence simultanée avec d'autres entités. La notion de coexistence a été formulée en 2003 par la Commission européenne afin de permettre aux agriculteurs d'avoir le libre choix de leurs productions, entre les différentes agricultures (OGM et non-OGM). Malgré la mise en place d'une traçabilité et d'un étiquetage obligatoire des OGM dans la législation européenne, la crainte des contaminations des productions agricoles n'a pas été réglée par ces points. Des travaux sur la coexistence ont été réalisés au sein de l'Union européenne, parmi lesquels le projet « SIGMEA » [58\*], datant de 2004, afin de proposer des moyens pour faciliter la coexistence, dans le respect des normes. Différentes stratégies, en termes d'étiquetage, de traçabilité et de gestion spatiale ont été mises en place dans le monde et en Europe.

#### 3.1.1. Exemple de la coexistence variétés OGM et non OGM

##### 3.1.1.1. Coexistence OGM-non OGM en Europe et dans le monde

En 2019, la culture d'organismes génétiquement modifiés représentait 10% des surfaces cultivées dans le monde, réparties sur 29 pays. Les Etats-Unis, le Brésil, l'Argentine, le Canada et l'Inde se partageaient 91% des surfaces d'OGM cultivées. Les cultures les plus représentées sont le coton, le soja, le maïs et le colza qui totalisent 99% des cultures d'OGM mondiales dont les traits principaux sont la résistance aux insectes et la tolérance à certains herbicides [24\*].

Au sein de l'Union européenne, la culture d'OGM est majoritairement interdite, à l'exception de l'Espagne et du Portugal qui totalisaient, en 2019, 107 000 hectares de surfaces cultivées pour l'un, et 5000 hectares pour l'autre, ce qui représentait un peu moins de 0.1% de la surface agricole totale européenne. Un seul évènement est autorisé à la culture, il s'agit du maïs MON810. Les procédures d'autorisations et d'étiquetages sont posées dans le règlement (CE) n°1829/2003 et par la directive 2001/18/CE. [54\*]

##### 3.1.1.1.1. La gestion spatiale liée à la culture d'OGM

Pour limiter l'impact des OGM sur les autres cultures, des stratégies ont été mises en place, afin de restreindre l'apparition de résistance dans les populations ciblées lorsque le gène est de type « résistance » à un ravageur, ou de limiter la dissémination des gènes génétiquement modifiés dans les cultures alentour. Ainsi, aux Etats-Unis, la mise en place d'une gestion spatiale pour prévenir les résistances a vu le jour avec l'agence de la protection environnementale (EPA = Environmental Protection Agency). L'EPA a fixé un pourcentage de zones refuges de 50% dans les zones de production de coton génétiquement modifié. Pour les plantes GM porteuses de plusieurs gènes BT (empilage), une zone refuge de 5% est conseillée. Pour faciliter le travail des agriculteurs et les inciter au respect des recommandations, il a été créé une technologie appelée « Refuge in the bag » (technologie RIB) pour créer un mélange de semences GM-non GM fixé en fonction du pourcentage requis de zones refuges pour la variété transgénique cultivée (Regnault-Roger, 2020).

Au Portugal, la gestion spatiale est destinée à limiter la présence accidentelle de pollen GM dans les parcelles alentour. Pour ce faire, un décret/loi n° 160/2005, adopté en 2005, réglemente et identifie les mesures spatiales à mettre en place dans les zones dédiées (Regnault-Roger, 2020). Ainsi, plusieurs propositions et recommandations y sont décrites,

veillant à prendre en compte les « types d'agricultures » avoisinants (conventionnel ou biologique), qui déterminent les mesures à prendre en fonction des seuils de présence fortuite fixés. Plusieurs mesures alternatives sont proposées, comme la mise en place de distances minimales d'isolement, de lignes « d'entourage », de cultures de maïs avec des semis échelonnés, ou encore de cultures avec des cycles végétatifs différents (Annexe I, partie A, 160/2005). Le gouvernement portugais a également établi « la création d'un fond d'indemnisation pour supporter tout dommage causé, de nature économique, résultant de la contamination accidentelle de la culture de variétés génétiquement modifiées, qui sera financé par les producteurs et les entités privées impliquées dans le processus de production respectif » (article 14, 160/2005).

#### 3.1.1.1.2. Des outils d'aide à l'élaboration de stratégies pour une meilleure coexistence ?

Aujourd'hui, le déploiement des NBT pose des questions similaires à celles formulées lors de l'apparition des OGM. Pour cela, il est intéressant de revenir aux travaux réalisés à l'échelle européenne, en particulier dans le cadre du projet SIGMEA. Ce projet européen SIGMEA (*Sustainable Introduction of GM crops into European Agriculture*) a été lancé en 2004, à la suite de l'établissement du principe de coexistence par la Commission européenne en 2003. Il avait pour objectif de rassembler l'ensemble des données européennes sur le flux de gènes et les impacts environnementaux des principales espèces concernées par les OGM (maïs, colza, betterave, riz, blé), de concevoir des modèles prédictifs du flux génétique au niveau du paysage, d'analyser la faisabilité technique et la pertinence économique de la coexistence dans les principales régions agricoles européennes, ceci afin de proposer des outils d'aide à la décision et de formuler des recommandations en termes de gestion et de gouvernance [25\*]. Parmi les outils d'aide à la décision, deux plateformes de modélisations relatives aux flux de gènes suivant les paysages (LandFlow-Gene) et relative aux impacts des cultures suivant le paysage alentour (LandSFACTS) pourraient être également utiles pour réfléchir à une gestion spatiale des NBTs.

La plateforme LandFlow-Gene permet de modéliser les flux de gènes suivant les paysages agricoles, en testant différents scénarios d'introduction des OGM, en tenant compte « de l'effet des pratiques et du climat ». La version actuelle est opérationnelle pour le maïs et le colza et peut être facilement étendue à d'autres espèces [26\*].

La plateforme LandSFACTS est « un outil de modélisation pour créer des scénarios de cultures ou d'utilisations des terres dans le paysage [...] Le modèle est actuellement utilisé pour créer des scénarios de systèmes de culture et d'utilisation des terres du niveau de la ferme à l'échelle régionale afin d'évaluer les services écosystémiques, tels que la biodiversité, la qualité de l'eau, l'érosion des sols, la séquestration du carbone » [27\*]. Il pourrait être une aide à la décision pour l'agriculteur.

#### 3.1.1.1.3. L'étiquetage en Europe et dans le monde

A l'heure actuelle, il n'existe pas de normes internationales sur l'étiquetage des aliments issus des OGM. Toutefois, il existe le *Codex Alimentarius* adopté par un organisme intergouvernemental, nommé « Commission du Codex Alimentarius ». La Commission a été créée en 1963 par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Il définit des normes générales, des lignes directrices et des codes d'usages pour les produits alimentaires. Ce code n'est pas d'application obligatoire mais sert de référence pour nombre de pays, qui alignent leurs normes alimentaires nationales au *Codex Alimentarius*. En plus de définir des lignes directrices, il a son importance lors de différends commerciaux. Toute demande de norme plus stricte que celle du Codex doit être justifiée scientifiquement [28\*].

### L'étiquetage au niveau international :

L'absence de normes internationales obligatoires sur la traçabilité et l'étiquetage des produits contenant des organismes génétiquement modifiés a vu naître une multiplicité de normes adoptées par les pays. Parmi cette diversité, cinq grandes stratégies semblent se dégager. La plus restrictive est celle adoptée par le Bénin, la Zambie et la Serbie, qui ont fait le choix d'interdire les importations et la culture d'aliments génétiquement modifiés [30\*] [29\*]. Les pays, tels que l'Australie, la Russie et les pays de l'Union européenne, ont fait le choix d'autoriser les OGM sous condition d'une législation stricte, rendant obligatoire l'étiquetage de presque tous les aliments génétiquement modifiés, avec la définition de seuils allant de 0,9 à 1 % [24\*] [30\*]. Une troisième catégorie se dégage par l'imposition d'un étiquetage pour des seuils de présence OGM dépassant les 1%. C'est le choix qu'ont fait le Brésil, la Corée du Sud, le Japon et l'Afrique du Sud [24\*] [30\*]. Des législations plus vagues en termes de normes reviennent à l'Inde, le Mali ou le Pérou qui ont fait le choix de rendre obligatoire l'étiquetage de certains aliments génétiquement modifiés listés, sans définition de seuils [24\*] [30\*]. Enfin, les pays d'Amérique du Nord, de nombreux pays d'Afrique et du Moyen-Orient ont souhaité ne pas rendre obligatoire l'étiquetage des produits contenant des organismes génétiquement modifiés. Au Canada et aux Etats-Unis, seuls les produits ayant une toxicité ou une substance allergène doivent être renseignés [24\*] [29\*] [30\*].

### L'étiquetage dans l'Union européenne :

Au sein de l'Union européenne, les réglementations (CE) n°1829/2003 et (CE) n°1830/2003 fixent les règles sur l'étiquetage des organismes génétiquement modifiés. La mention sur les produits est obligatoire, sauf dans le cas de présences fortuites ou inévitables ne dépassant pas le seuil de 0.9%. Pour les produits très transformés, l'étiquetage est obligatoire, lorsque la matière première est génétiquement modifiée, et ce, indépendamment de sa détectabilité. L'identification et la traçabilité obligatoire à tous les stades de production, ainsi que les méthodes de détection, permettent de contrôler la conformité de l'étiquetage. Le suivi documentaire se fait grâce à un code unique attribué à chaque OGM.

#### 3.1.1.2. Coexistence OGM-non OGM en France

La France est soumise à la réglementation européenne sur les OGM. En 2008, elle a fait le choix d'interdire leurs cultures à des fins commerciales par une mesure nationale, puis par une demande d'exclusion géographique, permise par la directive 2015/412. Si la culture sur le territoire est interdite, l'importation et la commercialisation de certains OGM sont autorisées pour l'alimentation humaine ou animale, ainsi que dans les espèces ornementales, telles que les œillets. Tout organisme génétiquement modifié commercialisé doit respecter les règles de traçabilité et d'étiquetage établies par l'Union européenne. En ce qui concerne la culture en champ pour des essais, il n'y en a pas sur le territoire depuis 2013 [32\*].

#### 3.1.2. Incidence de la mise en marché des variétés éditées sur les filières semences

La mise sur le marché de variétés issues des techniques NBT laisse présager un impact sur les différentes filières agricoles, car toute innovation technique génère des modifications des systèmes déjà présents, redistribuant parfois les cartes existantes. L'arrivée des OGM, hier, a posé de nombreuses questions qui ont abouti à la mise en place de la législation actuelle, répondant en partie aux craintes des acteurs du secteur. Aujourd'hui, les NBT interrogent et posent des questions sensiblement identiques à celles posées par les OGM, à la différence que ces nouvelles venues ne sont pas facilement détectables. Au-delà de l'approche

technique et de l'impact des traits développés, quelles sont les appréhensions vis-à-vis de leur mise sur le marché ? Le choix d'instruire la distinction entre la filière biologique et la filière agricole non biologique (dite « conventionnelle ») s'est fait naturellement, du fait des normes qui diffèrent entre les deux entités.

### 3.1.2.1. Incidences sur la filière biologique

L'agriculture biologique est un mode de production basé sur une approche écosystémique, soucieuse du respect des équilibres naturels, qui considère les interactions entre la plante et son environnement. Elle cherche à réduire les intrants, tout en cherchant l'innovation agronomique. Il s'agit d'une filière en pleine croissance avec une augmentation de l'ordre de 5% des surfaces agricoles européennes entre 2019 et 2020. Cette tendance devrait s'accroître dans le futur, avec un objectif établi dans le pacte vert de l'Union européenne, dont le taux est fixé à 25% à l'horizon 2030. En 2020, elle représentait 9.2% des surfaces agricoles totales [33\*].

L'utilisation d'Organismes Génétiquement Modifiés (OGM) dits réglementés, de pesticides et de fertilisants de synthèse sont exclus de l'agriculture biologique. En novembre 2017, l'IFOAM (*International Federation of Organic Agriculture Movements*) a affirmé sa position vis-à-vis des nouvelles techniques d'amélioration des plantes, considérant que ces dernières ne pouvaient pas être incluses dans l'agriculture biologique, à cause d'une incompatibilité avec les valeurs de la filière. Pour répondre à ces valeurs, les techniques de sélection doivent, selon IFOAM, assurer « le respect du génome et de la cellule » par le rejet de tout acte « d'insertion, de délétion ou de réarrangements techniques sur le génome, ou d'invasion technico-physique dans une cellule isolée ». Par ces précisions, les NBT seraient naturellement exclues des techniques de sélection compatibles avec les principes de l'AB portés par l'IFOAM [34\*].

### Quels sont les risques pour la filière biologique en cas de coexistence avec les NBT ?

Parmi les craintes du secteur, la coexistence au champ est l'une des principales préoccupations. La perspective d'une proximité spatiale avec un champ de plantes issues des NBT fait craindre la dé-certification des produits biologiques des fermes alentour. En effet, cela pourrait « forcer » des producteurs à déclasser leurs produits initialement destinés à l'AB, en produits pour le marché conventionnel, non AB, moins rémunérateur. Les risques de contaminations liées à la coexistence laissent craindre la destruction de réputations, la perte de marchés et l'abandon de cette agriculture dans les régions où il y aurait une coexistence « NBT-biologique ». Ces craintes prennent leur source sur des faits observés en Espagne, où, du fait de l'autorisation de la culture de maïs transgénique MON810 dans certaines régions et du risque élevé de contamination par les OGM, des agriculteurs ont décidé d'abandonner les cultures de maïs biologiques [35\*]. Additionné à cela, l'absence de méthodes de détection fiables des NBT accentue ces craintes. En effet, comment assurer une totale absence de NBT dans les produits biologiques, s'il n'est pas possible de les détecter ? Les acteurs de la filière proposent de mettre en place une obligation de divulgation des techniques de sélection utilisées afin de garantir le libre choix des agriculteurs et des consommateurs, pour pallier ce manque méthodologique de détection. En outre, ils souhaitent qu'un cadre réglementaire entourant le marché soit posé, afin de garantir la séparation entre les diverses agricultures, tout au long de la chaîne de production et distribution. Ils demandent la mise en place d'une traçabilité et d'un étiquetage suivi, afin de disposer d'un matériel génétique répondant aux valeurs de la filière.

### 3.1.2.2. Incidences potentielles sur les filières dites « conventionnelles »

#### Impacts sur la recherche variétale et l'équité entre les différents acteurs du secteur

Pour certains acteurs du secteur agricole, les méthodes NBT étant en constante évolution, il faut rester vigilant sur les améliorations à venir et se donner les moyens d'une veille technologique active sous peine d'utiliser des outils dépassés et moins bien adaptés à la problématique scientifique ou à l'offre variétale attendue. Toutefois, d'autres acteurs soulignent que le développement de ces nouvelles méthodes ne doit pas monopoliser toutes les ressources ; il faut conserver les moyens de travailler sur d'autres technologies. De plus, le développement des NBT pourrait constituer un risque d'incitation à ne développer que les filières rentables ayant investi beaucoup d'argent en recherche (des connaissances préalables précises sur les déterminismes génétiques des traits d'intérêt étant nécessaires pour l'édition de gènes) et dans des fonds génétiques performants.

Par ailleurs, la mauvaise aptitude de certaines espèces à la technique de culture *in vitro*, très largement utilisée dans la mutagenèse dirigée, laisse craindre l'exclusion de ces dernières aux évolutions techniques. Des recherches sont en cours pour s'affranchir de cette méthode afin que toutes les espèces soient égales face à l'accessibilité à de nouvelles techniques et aux évolutions variétales.

Enfin, au-delà des pré-requis techniques (connaissances génétiques sur l'espèce concernée, protocole de régénération...) à l'application des NBT, l'accès aux techniques d'édition du génome pour la recherche privée à des fins d'obtention variétale se fait au moyen de licences à obtenir auprès des titulaires de brevets sur la technique, dont le coût d'entrée peut être dissuasif au regard des enjeux ou objectifs poursuivis (voir chapitre 3.2.2.1). A cet égard, le maintien d'effort de recherche publique pour développer des systèmes d'édition du génome indépendants des techniques brevetées est un enjeu souligné par de nombreux intervenants.

#### Impacts sur la diversité cultivée

Les techniques NBT mobilisant des connaissances pointues en terme génétique, elles ne peuvent en l'état s'appliquer à toutes les espèces avec la même acuité. Ainsi, ces nouvelles techniques d'édition du génome ne peuvent être mobilisées, en l'état des connaissances, sur des espèces récalcitrantes à la culture *in vitro*, ou sur lesquelles trop peu de connaissances des génomes ont été développées. Un tel déploiement serait alors au détriment des filières mineures à faibles investissements en recherche, constituant ainsi un risque de réduction de la diversité des espèces et des fonds génétiques cultivés et un disservice au regard des objectifs du pacte vert européen.

De la même façon, les techniques d'édition du génome peuvent permettre des modifications de variétés élite, proposant ainsi différentes versions de la variété élite initiale, éditée pour tel ou tel caractère, laissant craindre une réduction de la diversité cultivée au sein d'une même espèce, ces techniques d'édition du génome ne mobilisant pas de brassage génétique, contrairement aux schémas de sélection classiques basés sur des croisements au sein d'un germplasm cultivé ou sauvage.

En miroir, les NBT pourraient aider à apporter des résistances aux maladies et des adaptations ciblées à certaines variétés patrimoniales, ce qui permettrait de garder ces variétés emblématiques en leur conférant des nouveaux traits sans modifier leurs caractéristiques technologiques.



### Les freins économiques liés à l'acceptabilité

De nombreux points ont été soulevés sur l'émergence des NBT et la perspective d'une coexistence avec les différentes filières agricoles (« conventionnelle », AB, etc...). L'acceptabilité sociétale des biotechnologies végétales est un point d'attention de l'ensemble des filières concernées. Il est ainsi vraisemblable que la mise sur le marché de variétés éditées soient accompagnées d'un système de traçabilité dont le coût ne pourra être supporté par les filières que si la valeur ajoutée de la variété est significative. Les conséquences économiques pourraient être différentes selon les filières et les espèces considérées.

Pour les espèces à faible retour financier pour les obtenteurs, la mise en place d'un tel système semble difficilement réalisable. Ainsi, d'un point de vue économique, la difficulté d'acceptation de ces techniques par le public et leur coût trop élevé pour les filières mineures, du fait d'une mise en place d'une traçabilité plus importante, posent de réelles questions.

Dans le cas du secteur légumier, les programmes de sélection sont généralement mondiaux, avec des enjeux de la santé publique, que ce soit en termes qualitatifs et quantitatifs. Ils doivent assurer une production suffisante, pour permettre des volumes accessibles par une majorité de la population et ce, malgré une baisse des intrants disponibles. Au regard de ces qualités nutritionnelles et du lien marqué entre les consommateurs et les légumes souvent achetés sans transformation, la question de l'usage de modifications de l'ADN interroge les acteurs des filières légumières. Cette interrogation est d'autant plus marquée que le consommateur ne voit pas aujourd'hui l'apport de ces techniques dans un contexte d'abondance de produits et de médiatisation négative des OGM.

*A contrario*, le secteur de la vigne estime que l'obtention des nouvelles variétés de porte-greffe par des technologies dites « NBT » pourrait être plus acceptable par la société et plus réalisable que pour les variétés à fruits, par exemple. La diversité chez les porte-greffes représente un enjeu moindre. En appliquant ce principe, il est possible de tenir deux raisonnements distincts pour la vigne : porte-greffe vs greffon. En effet, en éditant un porte-greffe, il n'aura pas d'incidence avec les autres variétés de porte-greffe, puisqu'il ne produira théoriquement pas de pollen. Les technologies dites « NBT » pourraient intéresser non seulement la filière viti/vinicole, mais aussi les filières du raisin de table ou même du raisin sec.

### La nomenclature des variétés éditées

Pour l'ensemble des espèces, les NBT pourraient aider à apporter des résistances aux maladies et des adaptations ciblées à certaines variétés patrimoniales, ce qui permettraient de garder ces variétés emblématiques en leur conférant des nouveaux traits sans modifier leurs caractéristiques technologiques. Cela pose toutefois des questions sur la nomenclature des variétés. En effet, dans le cas du secteur de la vigne, l'étiquetage des principales productions fait très largement référence au nom de la variété utilisée, tant pour les raisins de table que pour les vins. Les principales variétés françaises bénéficient d'une très forte notoriété auprès des consommateurs, en France comme à l'étranger, que ce soit pour des variétés largement utilisées à l'échelle du globe ou pour des variétés d'utilisation plus locale et très caractéristiques de certaines productions. La production viticole française est très fortement réglementée, notamment avec les cahiers des charges des 360 AOC viticoles et des deux AOP de raisins de table, qui décrivent précisément l'encépagement requis pour pouvoir prétendre au bénéfice de ces appellations d'origine. Cette constante référence aux noms des variétés dans l'étiquetage des produits viticoles obligera à s'interroger sur les conséquences d'un éventuel développement des nouvelles technologies dites « NBT », notamment sur la classification et la dénomination des futures obtentions végétales qui en découleraient, et sur les incidences commerciales et réglementaires. La connaissance précise des potentialités de ces nouvelles obtentions devra donc être facilement accessible aux viticulteurs, afin de les sécuriser dans leur choix lors de l'implantation d'un matériel destiné à être utilisé durant plusieurs décennies.

### 3.1.3. Incidence de la mise en marché des variétés éditées sur les ressources génétiques

#### 3.1.3.1. Définitions des RPG

Les ressources phytogénétiques (RPG) représentent l'ensemble des espèces végétales cultivées ou formes sauvages apparentées, des populations, et des variétés ayant une valeur effective ou potentielle pour l'alimentation et l'agriculture. Certaines de ces ressources sont conservées, caractérisées et diffusées en vue de leur utilisation durable, en particulier pour la recherche scientifique, l'innovation et la sélection variétale appliquée, ou pour leur aspect patrimonial. Sous forme de plantes, semences ou cultures, elles constituent un « réservoir » dans lequel l'Homme peut puiser pour faire face aux changements auxquels est soumise l'agriculture aujourd'hui, tout en permettant d'éviter la perte irréversible de ressources phytogénétiques stratégiques.

Les ressources phytogénétiques peuvent être conservées *in situ* ou *ex situ*, la différence se portant sur le lieu et les modalités de conservation. La conservation « *in situ* » désigne le maintien et la reconstitution d'espèces viables dans leur milieu naturel, tandis que la conservation « *ex situ* » désigne la conservation hors du milieu naturel [36\*][37\*][39\*].

Toute variété ayant été inscrite ou mise sur le marché peut être ensuite considérée comme une ressource phytogénétique. L'arrivée de variétés issues des NBT va-t-elle impacter ces ressources ? Si oui, dans quelles mesures ?

Au sein d'une même espèce, la notion de pangénome désigne l'ensemble des séquences présentes à l'échelle d'un groupe. Il est constitué du « core-génome », qui désigne les gènes présents chez tous les individus du groupe, auquel s'ajoutent les gènes propres à quelques individus. Ces notions sont devenues plus importantes aujourd'hui avec l'augmentation des génomes séquencés.

#### 3.1.3.2. Les RPG face à une nouvelle forme de diversité génétique

La diversité induite par des mutations naturelles a permis aux humains d'identifier des caractéristiques supplémentaires et de combiner de manière novatrice du matériel génétique pour créer de nouvelles variétés [38\*]. L'arrivée des NBT permet de créer une nouvelle diversité génétique grâce à la création de mutations ciblées dans le génome. L'apparition de ces nouvelles méthodes de sélection et de création variétales rend-elle caduque la nécessité de conserver des ressources phytogénétiques ? De nombreux mécanismes sont encore méconnus, tels que les différences phénotypiques liées à des phénomènes épigénétiques et non à des différences génétiques. Cela signifie que l'information génétique seule ne suffit pas aujourd'hui à expliquer toute la diversité observée et utilisable. La création d'une nouvelle diversité génétique induite par les méthodes NBT et les variétés qui en découleront ont-elles leur place dans les RPG ?

Les NBT sont tantôt identifiées comme sources de diversité génétique, tantôt comme sources potentielles de son appauvrissement. L'utilisation des NBT n'ouvrirait-elle pas la possibilité d'utiliser la diversité génétique de façon plus pertinente ? Par exemple, l'arrivée des NBT ne permettrait-elle pas de mieux valoriser les variétés anciennes, en ne modifiant que les traits « non désirés », et en gardant une grande partie du fonds génétique de la ressource génétique ?

Il faut rester prudent sur l'utilisation des plantes éditées non tracées et leur incidence sur la diversité naturelle. Les espèces apparentées sauvages, naturellement présentes sur le territoire français, sont encore peu ou pas connues du point de vue de la diversité des gènes présents. Il est primordial d'évaluer les conséquences potentielles des variétés éditées sur la diversité sauvage en fonction des traits visés pour éviter, par exemple, la diffusion de gènes

de résistance aux herbicides dans le réservoir de diversité sauvage. Il faut donc être particulièrement vigilant pour les collections « *in situ* ».

### 3.1.3.3. Les RPG face à la propriété intellectuelle

L'une des craintes récurrentes à propos des variétés éditées est la potentielle brevetabilité des traits, qui pourraient être obtenus par d'autres techniques d'obtention variétale (cf infra). En ce qui concerne l'incidence de la propriété intellectuelle sur les traits édités, la caractérisation plus large et profonde (accès au séquençage profond) des ressources phytogénétiques permettrait de décrire l'ampleur de la diversité phénotypique déjà disponible au sein des collections et au sein de la diversité mondiale. Cette connaissance pourrait-elle permettre de faire appel à l'état de la technique lorsqu'il y a un dépôt de brevet ? Plus on aura de connaissance des génomes, plus il y aura possibilité de prouver le caractère existant naturellement d'une modification.

## 3.2. Propriété Intellectuelle des variétés issues de NBTs, et incidence des différents types de Propriété Intellectuelle sur le marché

### 3.2.1. Types de Propriété Intellectuelle applicables aux variétés / inventions liées aux plantes, en France et dans l'Union européenne

#### 3.2.1.1. Le Certificat d'Obtention Végétale

Selon le site internet du GEVES, « Une nouvelle variété, sous réserve d'une issue favorable aux examens administratif et technique, peut faire l'objet d'une protection par un droit spécifique de la propriété intellectuelle : le certificat d'obtention végétale (COV). Ce droit confère à son titulaire [sur un territoire donné et pour une durée supérieure à 20 ans, et généralement comprise entre 25 et 30 ans] une exclusivité sur sa variété lui permettant certains actes : produire, reproduire, conditionner, offrir à la vente, vendre, commercialiser, exporter, importer, détenir à l'une de ces fins. Ce titre confère également à son titulaire le droit d'interdire l'utilisation de sa variété dite « protégée » par tout tiers sans son autorisation. Toutefois, et contrairement aux variétés brevetées, les variétés protégées par un COV peuvent être utilisées à des fins de sélection librement, sans contrepartie, ce qui favorise l'accès à la diversité génétique. C'est ce que l'on appelle l'exception du sélectionneur. » [55\*].

Le texte mentionne également que, « pour certaines espèces, les variétés protégées par un COV peuvent être utilisées sous forme de semences de ferme sous certaines conditions. » [55\*]. Cette spécificité est connue sous le terme d'exemption / privilège de l'agriculteur. Cette exemption donne le droit aux agriculteurs d'utiliser à des fins de reproduction ou de multiplication sur leur propre exploitation, sans l'autorisation de l'obteneur, le produit de la récolte qu'ils ont obtenu par la mise en culture d'une variété protégée. Ce privilège de l'agriculteur découle de la transposition en droit français et européen de la version 1991 de la convention UPOV, et n'est valable que sur une liste finie d'espèces ou groupes d'espèces (21 au niveau européen, 35 au niveau français). En ce cas, l'agriculteur doit alors verser une indemnité aux titulaires des certificats d'obtention végétale protégeant les variétés concernées, à l'exception des petits agriculteurs au sens de l'article 14 (3) du règlement (CE) n° 2100/94.

Les COV peuvent être délivrés par des offices nationaux (en France, par l'Instance Nationale des Obtentions Végétales – INOV), ou régionaux (en Union européenne, par l'Office Communautaire des Variétés Végétales – OCVV). La portée respective des droits ainsi conférés est alors nationale, ou régionale (ensemble du territoire de l'Union européenne). Les dispositions légales nationales et européennes sont globalement harmonisées avec le cadre

réglementaire international fixé par l'Union Internationale pour la Protection des Obtentions Végétales (UPOV), organisation intergouvernementale qui a établi la Convention Internationale pour la protection des obtentions végétales dont la première version date de 1961, révisée successivement en 1972, 1978 puis 1991. Actuellement, 78 Parties sont membres de la Convention UPOV, dont 76 Etats Membres et 2 organisations régionales, l'Union Européenne et l'Organisation Africaine de la Propriété Intellectuelle.

Au-delà des droits exclusifs conférés au titulaire sur la variété concernée, la protection du COV s'étend également, selon la Convention UPOV révisée en 1991, sur les variétés « essentiellement dérivées » de la variété protégée.

Selon cette Convention, « une variété est réputée essentiellement dérivée d'une autre variété ("variété initiale") si : i) elle est principalement dérivée de la variété initiale, ou d'une variété qui est elle-même principalement dérivée de la variété initiale, tout en conservant les expressions des caractères essentiels qui résultent du génotype ou de la combinaison de génotypes de la variété initiale, ii) elle se distingue nettement de la variété initiale et iii) sauf en ce qui concerne les différences résultant de la dérivation, elle est conforme à la variété initiale dans l'expression des caractères essentiels qui résultent du génotype ou de la combinaison de génotypes de la variété initiale ».

Cette notion d'essentielle dérivation a été introduite au début des années 90, concomitamment au développement des biotechnologies génétiques. Son objectif était d'équilibrer les droits couronnant un effort de recherche accompli soit par des obtenteurs « traditionnels » de variétés végétales, via des méthodes de sélection essentiellement biologiques, soit par des opérateurs actifs dans les biotechnologies génétiques. Cette notion d'essentielle dérivation visait donc à reconnaître une dépendance entre la variété essentiellement dérivée, pouvant elle-même faire l'objet d'un COV si l'ensemble des conditions de délivrance d'un COV sont respectées, et la variété initiale, la variété essentiellement dérivée étant couverte par le COV délivré sur la variété initiale. Cette notion juridique relevant de l'exercice du droit, pourtant présente dès 1991 dans la Convention UPOV, n'a été éclairée que par très peu de décisions de justice dans les Parties à la Convention UPOV, et fait encore l'objet de nombreux travaux d'explicitation, notamment dans les instances de l'UPOV.

### 3.2.1.2. Le brevet

La directive 98/44/CE du parlement européen et du conseil du 6 juillet 1998 relative à la protection juridique des inventions biotechnologiques, transposée en droit français dans le code de la propriété intellectuelle, indique que « sont brevetables les inventions nouvelles, impliquant une activité inventive et susceptibles d'application industrielle, même lorsqu'elles portent sur un produit composé de matière biologique ou en contenant, ou sur un procédé permettant de produire, de traiter ou d'utiliser de la matière biologique ». Par ailleurs, « une matière biologique isolée de son environnement naturel ou produite à l'aide d'un procédé technique peut être l'objet d'une invention, même lorsqu'elle préexistait à l'état naturel. ». Toutefois, sont notamment exclues de la brevetabilité « les variétés végétales » et « les procédés essentiellement biologiques pour l'obtention de végétaux... », tout comme les produits issus de ces procédés essentiellement biologiques.

Les brevets délivrés par les offices de brevets sont valables sur un territoire donné, et pour 20 ans à partir de la date de dépôt de la demande de protection. En Europe, les brevets peuvent être nationaux, ou plurinationaux (à ce jour, le dispositif de brevet unitaire européen n'est pas fonctionnel), délivrés soit par des offices de brevet nationaux (en France, l'Institut National de la Propriété Industrielle – INPI), soit par l'Office Européen des Brevets (OEB). L'OEB est l'organe exécutif de l'Organisation européenne des brevets, une organisation intergouvernementale comptant 38 États membres qui a établi la Convention sur le brevet européen, convention internationale encadrant la délivrance des brevets par l'OEB. Cette

convention sur le brevet européen a historiquement repris l'esprit des dispositions de la directive 98/44/CE.

L'étendue de la protection conférée par le brevet est déterminée par les revendications de son titulaire. Sont notamment interdites, à défaut de consentement du propriétaire du brevet, la fabrication, la mise dans le commerce, l'utilisation, l'importation, l'exportation, le transbordement, ou la détention du produit objet du brevet. Les droits conférés par le brevet ne s'étendent toutefois pas aux actes accomplis dans un cadre privé et à des fins non commerciales, ou aux actes accomplis à titre expérimental qui portent sur l'objet de l'invention brevetée. Une exemption de recherche limitée existe donc dans le droit des brevets.

Les articles (L613-2-1, L613-2-2 et L613-2-3) du Code de la Propriété Intellectuelle français spécifient particulièrement la portée de brevets concernant des séquences géniques. Ces précisions ont été apportées en 2004, 2014 et 2016 et sont issues de travaux législatifs européens ou français. A cet égard, le droit français prévoit une disposition particulière en cas de présence fortuite ou accidentelle d'une information génétique brevetée dans des semences, en exposant que « la protection conférée par un brevet à un produit contenant une information génétique [...] ne s'applique pas en cas de présence fortuite ou accidentelle d'une information génétique brevetée dans des semences, des matériels de multiplication des végétaux, des plants et plantes ou parties de plantes » (article L 613-2-2).

Enfin, une exemption de l'agriculteur a également été introduite dans la directive 98/44/CE.

### 3.2.1.3. Licences croisées

Ces deux titres de propriété intellectuelle couvrent des objets différents, mais peuvent toutefois concerner la même variété, par exemple lorsque la variété est couverte par un COV et possède un trait breveté. Ces titres de propriété intellectuelle peuvent être délivrés au même titulaire. Cette situation de cohabitation entre ces deux types de titre peut également concerner des titulaires différents. Selon la directive 98/44/CE du parlement européen et du conseil du 6 juillet 1998 relative à la protection juridique des inventions biotechnologiques, il est précisé dans l'article 12 relative aux licences obligatoires pour dépendance, que « Lorsqu'un obtenteur ne peut obtenir ou exploiter un droit d'obtention végétale sans porter atteinte à un brevet antérieur » ou « lorsque les titulaires d'un brevet concernant une invention biotechnologique qui ne pourrait pas exploiter celle-ci sans porter atteinte à un droit d'obtention végétale antérieur sur une variété », ils peuvent demander une licence obligatoire pour l'exploitation non exclusive » de l'élément protégé « [...] moyennant une redevance appropriée. [...] lorsqu'une telle licence est accordée, l'obteneur ou le titulaire du brevet a droit à une licence réciproque à des conditions raisonnables pour utiliser la variété protégée ou l'invention protégée ».

L'article susmentionné précise cependant que les demandes de ces licences ne se font que dans le cas où les demandeurs établissent « qu'ils se sont vainement adressés au titulaire du brevet ou du droit d'obtention végétale pour obtenir une licence contractuelle » et que « la variété ou l'invention représente un progrès technique important d'un intérêt économique considérable par rapport à l'invention revendiquée dans le brevet ou à la variété végétale protégée ». Ces licences sont octroyées par une ou plusieurs autorités compétentes, désignées par chaque État membre de l'union européenne (98/44/CE). A ce jour, cette possibilité de licences croisées entre brevet et COV n'a été que très peu / pas utilisée.

## 3.2.2. Incidence des différents types de Propriété Intellectuelle sur la filière semences et plants

### 3.2.2.1. Accessibilité aux techniques d'édition du génome

Les procédés d'édition des génomes font très majoritairement l'objet de brevets. Parmi l'ensemble des procédés, la voie CRISPR/Cas est couverte par une série large de brevets sur les procédés, déposés par différents opérateurs. Mais, en production végétale, en Europe, une seule entreprise américaine, Corteva, a obtenu la quasi-totalité des droits de licence. En situation de quasi-monopole, le déploiement des techniques d'édition des génomes pose des questions d'accès à la technique. En effet, les conditions d'accès à la technologie brevetée conduisent à s'interroger sur le fait que cette technologie soit abordable pour tous les opérateurs économiques, compte-tenu des gains attendus par le détenteur des droits de licence et de la taille des marchés potentiels. Si le coût d'accès à la technique devenait excessif, il pourrait également scinder les entreprises de sélection, selon qu'elles disposent ou non de l'accès à cette technologie, et éventuellement conduire à la disparition des acteurs n'ayant pas accès à l'outil, le coût d'entrée et le risque économique de l'acquisition des droits étant trop élevés.

De nombreuses discussions ont eu lieu au cours des années récentes pour savoir si, à l'échelle nationale ou à l'échelle européenne, il y aurait un sens à la création et à la protection de technologies détenues en propre par l'ensemble de la communauté nationale, y compris organismes de recherche et entreprises. Cette voie pourrait être alimentée par le PEPR « Sélection Végétale Avancée pour l'adaptation au changement climatique et la transition agroécologique » qui devrait débiter au début 2023. Mais cette voie semble difficile à suivre, car la compétition internationale est majeure sur ce sujet et il semble difficile d'imaginer des procédés très efficaces qui seraient alternatifs à CRISPR/Cas.

Plus encore, l'utilisation des brevets est possible à des fins de recherche et est gratuite pour les organismes de recherche s'il s'agit de produire de la connaissance et des publications. De fait, cet accès gratuit vient renforcer l'utilisation des brevets détenus par l'entreprise pré-citée. Il y a donc un effet d'auto-renforcement qui se met en place progressivement, et ceci dans l'ensemble des pays européens.

### 3.2.2.2. Brevetabilité des gènes

Depuis de nombreuses années, l'interface entre les 2 titres de propriété intellectuelle applicables aux inventions liées aux plantes que sont brevet et COV est un sujet de crispation. Ce sujet semblait avoir trouvé un certain point d'équilibre depuis les derniers développements à l'OEB au sujet de l'exclusion de la brevetabilité des produits issus de procédés essentiellement biologiques.

#### Les brevets sur les allèles natifs

Cependant, et indépendamment des nouvelles techniques d'édition du génome, il est utile de rappeler que la délivrance de brevet sur des allèles natifs découverts dans des accessions de ressources génétiques est une réalité permise par la directive 98/44, et son application / transposition dans les textes de l'OEB. Cette possibilité de poser un brevet sur un trait édité génère une tension et une difficulté majeure. Le « disclaimer » (avertissement) récemment introduit par l'OEB pour des brevets portant sur un allèle natif caractérisé spécifiant que le droit de PI délivré ne s'applique pas à un allèle identique découvert par une autre voie (ie par une autre accession) ne résout pas entièrement le problème, l'accession initiale n'étant que partiellement décrite / nommée dans les brevets délivrés. La délivrance de tels brevets réduit *de facto* l'usage de ces allèles d'intérêt, pourtant natifs, dans d'autres programmes de sélection, amenuisant l'opportunité pour les producteurs et la société en général de diversifier

les fournisseurs de génétique d'intérêt. Ce sujet n'est enfin pas décorrélé des discussions sur les Digital Sequence Information (DSI, Informations de Séquençage Numérique), et les revendications d'accès sans partage des avantages à ces séquences génétiques de la part de certaines parties prenantes actives dans le domaine de la sélection végétale. Ce constat fait le lien avec la question des ressources phytogénétiques évoquée plus haut et souligne l'enjeu d'avoir un séquençage profond pour pouvoir mieux documenter l'ensemble des gènes natifs.

Dans ce paysage de titres de propriété intellectuelle, le développement des NBT conduit à un renforcement des questions liées à la propriété intellectuelle, car aboutissant potentiellement à une recrudescence des éléments brevetés dans les variétés commercialisées. Pour comprendre en quoi la propriété intellectuelle peut être source d'appréhension, il convient de présenter quelques exemples de brevets utilisant la méthode CRISPR/Cas à des fins d'amélioration des plantes. Le brevet peut concerner le gène ou le procédé.

#### Les brevets utilisant la méthode CRISPR/Cas à des fins d'amélioration des plantes

Un brevet (en cours d'instance), concernant les Solanaceae, a été déposé sur les gènes mutants *Solyc04g005320* ; *Solyc12g038510* ; *Solyc03gl 14840* (référence WO2018213538A1). Ces modifications confèrent à la plante un ou plusieurs traits améliorés, tels qu'une **architecture d'inflorescence** modifiée, un **nombre de fleurs** modifié, un **nombre de fruits** modifié, un **rendement** plus élevé, des produits de meilleure **qualité** et une **productivité** des fruits plus élevée. Les revendications du brevet en cours d'instruction précisent que les gènes homologues à ceux cités précédemment, qui présenteraient cette mutation, sont soumis au brevet.

Un brevet a été accordé sur des plants de blé mutants **résistants à l'oïdium**, dont les mutations ont conduit à une perte de fonction de *TaMLO-A1*, *TaMLO-B1* et *TaMLO-D1*, par les méthodes TALEN et CRISPR/Cas9. Le présent brevet prévoit également « des procédés permettant de déterminer la présence ou l'absence d'acides nucléiques ou de polypeptides mutants *TaMLO-A1*, *TaMLO-B1* et/ou *TaMLO-D1* dans une plante de blé » (Référence CN106164272B). Ici, la plante porteuse de ces mutations est soumise au brevet, mais il est également spécifié que chaque gène mutant, pris séparément, avec la séquence détaillée, est soumis à ce brevet.

Un brevet, toujours en cours d'étude, a été déposé sur le **dispositif pour modifier** le gène PSY1 de la tomate, impliqué dans la maturité des fruits des tomates. Le présent brevet, concerne la construction d'un système CRISPR/Cas9 ciblant le gène *PSY 1* de la tomate (référence CN106636182B). Sur le même thème, un autre brevet, repose sur la construction du système CRISPR/Cas9 spécifiquement travaillé pour agir sur les gènes *TaAGO4a*, qui joue un rôle dans la résistance aux maladies du blé (référence CN105316327B). Le gène *TaAGO4a* possède 3 copies sur les chromosomes 3A, 3B et 3D. Le système CRISPR/Cas9 soumis au brevet est spécifiquement produit pour créer des mutations sur les trois copies citées, afin de rendre partiellement ou complètement silencieux le gène *TaAGO4a*.

Autre exemple de brevet, chez le soja, qui protège la **méthode d'extinction** des gènes *GmLox1*, *GmLox2* et *GmLox3*, par la méthode CRISPR/Cas9. Cette extinction permet de retirer le « goût de haricot » du soja ainsi que son amertume (référence CN110684796B). Un brevet, en cours d'instance, a été déposé sur un procédé utilisant le système Adenine Base Editor (ABE), créé pour agir dans la région promotrice du gène *Bsr1* en dehors du site d'initiation, conférant une amélioration de la résistance du riz face à la maladie de la brunissure du riz (*Pyricularia oryzae*) (référence CN109652439A).

Ces quelques exemples permettent de mettre en lumière les protections intellectuelles actuellement déposées en utilisant la méthode CRISPR/Cas9. Le brevet peut porter sur des gènes mutés (référence CN106164272B). La protection peut également porter sur le procédé qui permet d'obtenir des traits (ces derniers étant alors en tant que tels non soumis au brevet,

sauf lorsqu'il y a utilisation de la méthode détaillée dans le brevet). Dans les deux cas, cela laisse supposer que l'obtention du gène muté et/ou du trait par une méthode alternative aux NBTs doit être très largement documentée pour éviter le règlement de la licence.

On peut toutefois constater que la plupart des brevets accessibles sur les sites qui les recensent protègent en majorité le procédé et très peu protègent des gènes édités et les plantes qui les portent. Cela pourrait s'expliquer par la jeunesse de la technique, qui propose une innovation dans les techniques utilisées mais pas encore une innovation de rupture concernant les gènes édités.

La ligne de partage est majeure. S'il est cohérent avec le cadre international sur les brevets de protéger les technologies, l'extension à la protection du vivant (gène, trait, plante) est la pierre d'achoppement principale. Dans le cadre législatif actuel, elle relève de la seule décision de celui qui a créé le matériel nouveau, et peut être portée par deux motivations : i) un retour financier permettant de couvrir les investissements faits pour la création, ii) la volonté de rendre exclusif la commercialisation du matériel portant un trait original, ce qui est aussi une façon de maximiser un retour financier.

### 3.2.2.3. [Transparence sur les caractères édités faisant l'objet d'un brevet, en vue de leur utilisation en sélection](#)

Le sujet de la transparence des brevets contenus / portés par une variété mise en marché se pose. En effet, l'exemption du sélectionneur, reconnue dès les années 60 par la Convention UPOV, met à disposition toute variété protégée par COV comme ressource génétique utilisable dans les programmes de sélection de la concurrence, à la seule condition que la variété *in fine* obtenue par la concurrence soit nettement distincte de la variété initiale. En revanche, dans le cadre du brevet, si un sélectionneur utilise une variété contenant un élément breveté (exemple d'un gène / allèle breveté), soit il obtient une licence sur ce brevet pour pouvoir exploiter les services apportés par le trait édité, soit il doit s'assurer de ne pas conserver cet élément breveté à la fin de son programme de sélection, sans quoi il pourra être considéré comme contrefacteur. Ainsi, les obtenteurs doivent « épurer » de leurs programmes de sélection tout élément breveté pour lequel ils n'auront pas obtenu de licence. Si les OGM sont repérés facilement dans un génome du fait de séquences vectrices spécifiques, les NBT ne peuvent pas être tracés aisément. Ces éléments brevetés ne peuvent donc être recherchés qu'à l'aide d'un suivi minutieux et régulier des bases d'information brevets (dont celle de l'OEB), imposant une professionnalisation juridique du métier de sélectionneur et un laboratoire de biologie moléculaire performant, ce qui n'est pas à la portée de tous les opérateurs économiques actifs dans le domaine de l'obtention. A ce jour, la vérification de la liberté d'exploitation est à la charge des potentiels contrefacteurs, et la recherche de l'information sur les éléments brevetés dans une variété / accession intégrée dans les programmes de sélection est une difficulté. L'autre difficulté demeure dans le suivi des allèles NBT avec les outils moléculaires adaptés (séquençage ou autre).

Faisant le constat de cette difficulté, des entreprises semencières possédant également des portefeuilles de brevets portant sur des variétés ont mis en place des initiatives de plateformes de licences (licensing platform). Ces initiatives européennes (International Licensing Platform – ILP- portant sur des espèces légumières, Agricultural Crop Licensing Platform – ACLP – portant sur les espèces agricoles) regroupent quelques entreprises engagées pour faciliter l'octroi de licences sur leurs brevets respectifs et donner une information sur les brevets associés aux variétés développées. Ces initiatives professionnelles reposent sur la complétude d'une base de données, la base PINTO, mise en place par l'association des sélectionneurs européens (Euroseeds) qui a vocation à compiler, sur la base de contributions volontaires et déclaratives, les brevets portant sur des variétés commercialisées. Compte-tenu de sa portée volontaire et déclarative, le contenu de la base PINTO n'est toutefois ni exhaustif ni garanti par les pouvoirs publics.



Comme mentionné précédemment sur les questions de coexistence, cette transparence sur les traits édités, protégés ou non par brevet, sera indispensable au moment de la mise en culture des variétés et de la mise en marché des produits de récolte. En effet, que ce soit en raison de cahiers des charges ou en vue de répondre aux attentes des consommateurs, il peut être attendu une absence de traits édités. La transparence doit donc exister tout au long de la chaîne de valeur, depuis les sélectionneurs, jusqu'aux agriculteurs et aux metteurs en marché.

#### 3.2.2.4. Variétés éditées et essentielle dérivation

Sans présager de l'issue des réflexions en cours au sein des instances UPOV ou de décisions de justice statuant notamment sur les sujets relevant de l'exercice du droit, la notion d'essentielle dérivation apparaît de nouveau d'intérêt dans le contexte de développement des NBTs. En effet, ces nouvelles techniques permettent l'édition ponctuelle, par un opérateur, d'une variété protégée par un COV délivré à un autre titulaire. C'est le pendant du point précédent.

L'élaboration de notes explicatives de l'UPOV sont attendues pour apporter de la sécurité juridique et fournir des clés d'interprétation harmonisées aux différentes juridictions des Parties à la Convention UPOV.

Si la dépendance d'une variété essentiellement dérivée de sa variété initiale relève de l'exercice d'un droit privé, ces questions peuvent également avoir des répercussions sur le droit public. Ainsi, la reconnaissance de la filiation avec la variété d'origine est un point critique pour le secteur viticole, pour accorder une dénomination de la variété dérivée, dénomination qui pourrait apparaître sur les étiquettes des bouteilles de vin, non trompeuse.

### 3.3. Vers une accélération des créations variétales grâce à l'édition des génomes ?

Tout au long de ce rapport, il a été question d'accélération des processus de sélection pour répondre aux défis posés à l'agriculture et à l'alimentation, et en particulier la transition agroécologique et l'adaptation au changement climatique.

Toutefois, au regard des éléments évoqués dans le chapitre 3, est-il réaliste d'imaginer qu'il y aura une accélération effective du processus de sélection et donc de l'offre variétale ? Plusieurs éléments permettent d'en douter et sont autant de points d'attention au moment de construire le cadre d'utilisation de cette innovation technologique.

Actuellement, le mode d'obtention variétale par les NBT est encore très controversé et grande source de suspicion pour nombre d'acteurs du secteur et pour les consommateurs. Deux grands paramètres sont à prendre en compte : l'acceptabilité du consommateur qui sera l'élément déterminant pour le développement de variétés NBT et les contrôles réalisés sur les nouvelles variétés. Pour lever nombre de suspicions et pour justifier l'innocuité des variétés éditées, ne faudra-t-il pas augmenter le nombre de contrôles pour rassurer les consommateurs ? Dans ce cas, l'augmentation du temps d'évaluation variétale risque de compenser cette accélération technique.

. **Pour lever ce frein**, il conviendra

- D'être explicite sur les services attendus et disservices possibles au moment de l'utilisation des nouvelles variétés dans les systèmes de culture
- D'associer largement les utilisateurs tout au long de la chaîne de valeur dans les processus de conception et la définition des règles d'évaluation. Cette démarche s'inspire des logiques participatives et des living labs. Le CTPS peut constituer le tiers de confiance indispensable pour que ces processus vertueux existent.

Le deuxième point qui peut nuancer cette notion d'accélération de l'offre variétale est la possibilité de voir ces nouvelles variétés éditées refusées lors de l'évaluation variétale. Comme cela a été évoqué dans ce rapport, il est possible que certaines variétés, dont quelques traits ont été obtenus par NBTs, ne soient pas suffisamment distinctes, au niveau de la DHS. Comment cela va-t-il être géré ? Risquons-nous de voir une amélioration « silencieuse » des variétés élites, permettant d'augmenter leur temps de commercialisation ? Ceci se traduirait par un renforcement des innovations incrémentales limitées alors même que les objectifs de souveraineté alimentaire, de performance environnementale et d'adaptation au changement climatique exigent des innovations de rupture. **Pour lever ce frein**, il faut prendre en compte conjointement la question de la protection des obtentions et celle de l'orientation du progrès génétique. Durant la seconde moitié du 20<sup>ème</sup> siècle, la combinaison des logiques d'évaluation pour l'inscription aux catalogues nationaux et des logiques de protection par le COV a permis de répondre au défi de la performance productive et de la sécurité alimentaire dans l'ensemble des pays européens en accélérant la sélection dans une démarche d'innovation ouverte et où la variabilité génétique était considérée comme un bien commun.

Le troisième point, déjà évoqué dans ce rapport, est la brevetabilité des traits édités. La présence de ce titre de propriété intellectuelle va semble-t-il rendre le travail du sélectionneur plus long pour s'assurer de ne pas se retrouver en position de contrefacteur. Comme cela a été évoqué, les nombreuses initiatives des sélectionneurs ont permis la mise en place de plateformes recensant les brevets, mais elles ne sont pas exhaustives du fait de la non-obligation d'informer ces plateformes des brevets existants et ne rassemblent pas tous les acteurs. Cela va également limiter le travail d'édition (et de protection des traits édités) sur quelques espèces majeures. **Pour lever ce frein**, il conviendrait que l'ensemble des opérateurs décident de ne pas poser de brevets sur les traits édités.

**En conclusion**, la possibilité d'accès au marché de variétés présentant des traits issus de techniques NBT aura pour conséquence la coexistence sur le marché de variétés issues de NBTs, et de variétés non issues de NBTs. En outre, contrairement aux OGM, il n'y a pas de solution facile à la détection des variétés porteuses de traits édités, dont la segmentation reposerait sur un processus lourd et coûteux (séquençage et engagement de l'ensemble des acteurs, en l'absence de méthodes de détection spécifique). Ceci nuirait au suivi de ces éditions dans le compartiment cultivé, à la détection de fuites dans le compartiment sauvage. Cette difficulté s'ajoute à celles déjà présentes chez les OGM, et rend la coexistence des filières très difficile. Pour assurer une coexistence entre variétés éditées et non éditées, la notion de traçabilité est cruciale. Dans l'hypothèse d'une mise en place de filière « NBT-free » (absence de NBT), le support du coût de la certification de ces filières sera une question à traiter en priorité. Le risque existe de cristalliser certaines positions opposées (AB, CRISPR-free, conventionnel, édition intensive), avec un risque de disparition de certains types de variétés. L'acceptabilité sociétale d'une offre alimentaire issue pour partie de produits de filière NBT doit être clairement prise en compte. Il est important dans les discussions et réflexions de souligner la différence entre variétés éditées et variétés OGM, de façon factuelle et non émotionnelle.

La mise en marché de variétés issues des NBT peut également avoir des impacts sur les ressources phytogénétiques. Les méthodes NBT donnent accès à une infinité d'allèles, et pourraient conduire à relâcher la gestion des ressources phytogénétiques, ou à abandonner leur conservation. Il faudra être vigilant sur ce point, car l'utilisation en sélection classique de ces ressources a contribué jusqu'à présent à la résilience de l'agriculture. Dans ce contexte, il est indispensable de mieux les caractériser, pour une meilleure utilisation mais aussi pour avoir une comparaison avec les traits édités revendiqués, et de les préserver.

La Propriété Intellectuelle des variétés issues de NBT peut relever des COV sur les variétés, des brevets sur les méthodes utilisées pour obtenir les variétés et des brevets sur les traits édités. Le déploiement des techniques d'édition des génomes, procédés faisant très majoritairement l'objet de brevets et de licences, pose des questions d'accès à la technique. Le coût d'entrée est important, conduisant à des difficultés d'accès pour certaines espèces, filières et opérateurs économiques. Ceci pourrait se traduire par une concentration des efforts de recherche sur certaines espèces, et certains types variétaux/traits, en opposition avec la diversification nécessaire pour l'agroécologie. Comme pour chaque évolution méthodologique, mais peut-être plus encore ici, des secteurs et des acteurs risquent de se voir pénalisés par l'arrivée des NBTs, au détriment de l'agriculture et de sa durabilité. De nouveaux acteurs apparaîtront, sans doute du côté de l'offre technologique, mais sans apporter de fonds génétiques. Par ailleurs, indépendamment des nouvelles techniques d'édition du génome, il est utile de rappeler que la délivrance de brevet sur des allèles natifs découverts dans des accessions de ressources génétiques est une réalité, même si le nombre est limité. Toutefois, dans ce paysage de titres de propriété intellectuelle, le développement des NBT et de brevets sur les traits édités conduira à un renforcement des questions liées à la propriété intellectuelle, car aboutissant potentiellement à une recrudescence des éléments brevetés dans les variétés commercialisées. Pour faciliter le travail des sélectionneurs et, en cohérence avec les besoins de traçabilité sus-cités, l'accès à l'information sur la propriété intellectuelle attachée aux variétés commercialisées, et notamment concernant les traits édités, est un enjeu d'importance. Mais une plus grande occurrence d'éléments brevetés dans les variétés pourrait conduire à de plus nombreux obstacles à l'inclusion des variétés concernées dans les programmes de sélection, avec des royalties à verser ou la nécessité d'éliminer les allèles brevetés des variétés dérivées. Ceci pourrait constituer une seconde entrave à l'exemption du sélectionneur portée dans le droit français. Pour tirer réellement profit des apports de ces technologies et favoriser le progrès génétique sur des traits nouveaux répondant aux enjeux de la transition agroécologique et de l'adaptation au changement climatique, il conviendrait que l'ensemble des opérateurs décident de ne pas poser de brevets sur les traits édités. Ceci permettrait de maintenir le fonctionnement en innovation ouverte qui caractérise le COV.

## Conclusion

L'analyse des travaux scientifiques et techniques dans le champ de l'édition des génomes montrent que depuis 2016, date du précédent rapport de saisine du Comité Scientifique du CTPS sur ce sujet, il y a eu des avancées technologiques majeures, surtout centrées sur la technologie CRISPR/Cas, conduisant à un abandon des autres technologies d'édition du génome. Ces avancées permettent d'avoir des interventions fines, et sur une plus grande diversité de cibles moléculaires, et donc de traits. Ceci s'est traduit par une explosion de la littérature scientifique et du nombre de brevets déposés. La présence de la France et de l'Europe dans ces activités de publications et de dépôts de brevets est réelle mais loin derrière les acteurs majeurs que sont la Chine et les Etats-Unis. Il convient d'assurer la poursuite et le renforcement de l'effort de recherche publique et de l'investissement par les entreprises du secteur. Le développement du potentiel technologique est essentiel pour améliorer l'efficacité de la méthode et la possibilité de l'utiliser sur une gamme élargie d'espèces, y compris celles qui sont aujourd'hui considérées comme récalcitrantes. Il conviendra de s'interroger sur la possibilité et la pertinence que cet effort puisse conduire au développement de technologies libres de droit de licence.

Si un grand nombre de traits ont fait l'objet de travaux d'édition publiés, il s'agit surtout à ce stade de preuves de concept, sur un nombre limité d'espèces agricoles, avec peu de retombées pratiques et en particulier il n'y a guère de production sur des traits permettant des ruptures fortes susceptibles de contribuer à la transition agroécologique, à la demande de souveraineté alimentaire ou à l'adaptation au changement climatique. Il est fait l'hypothèse que ceci est le fait d'un décalage temporel lié à des technologies vraiment récentes, et qu'il y a une réelle perspective d'accélération, si les considérants économiques et sociaux ne l'entravent pas. Afin que les traits édités répondent aux besoins prioritaires des acteurs économiques (production, qualité technologique, nutritionnelle et organoleptique) et de la société (valeur environnementale, adaptation au changement climatique), il convient de favoriser les approches systémiques, dans la définition des éditions, mais surtout dans le choix des traits cibles, de leurs modifications, et de leurs usages.

Pour que l'édition du génome puisse être mise en œuvre avec efficacité, il est impératif de disposer d'une connaissance renforcée des mécanismes sous-jacents aux traits dont l'amélioration génétique est souhaitée. Ceci impose de disposer d'un acquis biomoléculaire très important. Ceci constitue le coût d'entrée dans la technologie, plus élevé pour les espèces les moins développées ou pour les fonctions/traites les moins explorés sur un plan académique. Mais cette approche, reposant sur du séquençage profond et de l'analyse biostatistique, permet aussi de disposer d'outils indispensables pour une caractérisation des ressources phytogénétiques et ainsi savoir si les traits édités sont originaux ou reproduisent une variation existant naturellement et préservée dans les collections. Ceci permet aussi de disposer des outils pour assurer la traçabilité des éditions.

La caractérisation phénotypique du matériel génétique nouveau créé par édition du génome est indispensable. Pour les traits édités correspondant à des caractères naturellement variables et ayant déjà fait l'objet d'étude au moment de l'inscription, il n'apparaît pas nécessaire de modifier les processus. En revanche, pour des innovations disruptives créant de nouveaux traits, il conviendrait de procéder à une évaluation qui cherchera à caractériser à la fois les services et les disservices, à une échelle de temps et d'espace adaptée au trait dont l'amélioration est revendiquée, à son usage, et à sa compatibilité avec les autres méthodes de sélection. Ainsi, les NBT ne conduisent pas à une remise en cause des principes majeurs de l'évaluation des variétés en vue de leur inscription sur les catalogues nationaux, ni la capacité du CTPS à piloter ce travail d'évaluation.

Parmi les potentiels disservices à considérer, le Comité Scientifique du CTPS a considéré qu'il faut porter attention à différentes composantes :

- l'impact sur le pool génétique cultivé, et en premier lieu le risque de concentration des efforts de recherche sur certaines espèces avec un risque d'homogénéisation en espèce et en variétés, voire en gènes ; mais aussi aux problèmes éventuels de compatibilité génétique entre les variétés éditées de façon disruptive et le germplasm de l'espèce.
- l'impact non désiré sur les communautés spontanées associées aux cultures (microbiote, insectes non-cibles impactés par des résistances aux ravageurs, ...). Le rôle du microbiote pour la protection des plantes contre les bioagresseurs est maintenant établi, de même que l'effet du génotype végétal sur la taille et la composition spécifique des micro-organismes hébergés, à la fois au niveau de la racine, des feuilles ou de l'endosphère. De même que des variations non expliquées ont été observées entre microbiotes hébergés par des génotypes différents d'une même espèce, il conviendra de vérifier l'innocuité des variétés éditées sur la taille et la composition des communautés microbiennes.
- la fuite dans l'écosystème naturel (espèce apparentée...) et le déséquilibre induit sur certaines communautés, ainsi que la perturbation de leur fonctionnement
- le disservice économique, avec perturbation voire disparition de pans de filières, ayant des vertus agroécologiques sur le long terme (greffe par exemple)
- la toxicité, dans le cas de production de nouveaux composés secondaires.

La question de l'acceptabilité sociale des plantes éditées doit clairement être posée pour y trouver une réponse. Ceci doit conduire à réfléchir aux traits dont l'édition permettrait un bénéfice largement partagé par les différents acteurs. L'acceptabilité concerne tout à la fois la technologie, l'espèce, le trait édité, et son usage.

Les différences quant à l'acceptabilité de la technologie conduisent d'abord à s'interroger sur le champ de la technologie. Sur la base des réflexions de la Commission européenne, il convient de ne pas considérer à ce stade les éditions de type SDN3, puisque technologie de modification génétique. La cisgénèse mérite une attention particulière, en s'interrogeant sur son apport comparatif vis-à-vis de technologies d'amélioration classique renforcées de l'usage de la sélection génomique et de la sélection assistée par marqueurs. La réflexion sur l'acceptabilité des technologies impose aussi d'envisager la mise en place des conditions permettant la coexistence NBT/NBTfree et de se préoccuper des conséquences de cette coexistence. La principale condition de coexistence est l'existence de technologies permettant d'assurer la traçabilité. La principale conséquence ou incidence d'une nécessaire coexistence est qu'il est impératif que le flot de variétés à haut potentiel mais non-éditées soit maintenu.

L'identification des traits à éditer ne peut pas se faire sur la seule base de la maximisation des performances productives. Il est essentiel que les traits, de qualité et de valeur alimentaire, de résistance biotique et abiotique, de résilience face au changement climatique, concilient des réponses aux attentes légitimes des consommateurs et citoyens et aux attentes des opérateurs économiques. Il convient donc de s'interroger sur les éventuelles limites à l'utilisation des NBT qu'il serait utile de poser, et de savoir si l'édition de tous les gènes est recevable. Ne faut-il pas, par exemple, interdire l'édition de gènes codant pour ou régulant des fonctions physiologiques fondamentales, en les sanctuarisant, au titre de leur rôle dans le fonctionnement de l'espèce, de l'ordre ou du règne ? Il est donc essentiel que les traits édités concernent tout à la fois des biens privés et des biens communs. Le suivi des traits édités pourrait s'inscrire dans la fonction d'un comité chargé d'encadrer l'utilisation de l'édition du génome.

Un autre gage de l'acceptabilité peut être l'assurance que les espèces mineures, susceptibles de contribuer à la diversification, ne pâtissent pas de ces développements, et bénéficient d'efforts de recherche plus soutenus, en sélection génétique/génomique ainsi qu'avec ces

technologies. Le ticket d'entrée à l'usage de ces technologies est important, avec des difficultés pour les espèces et filières dites "mineures". C'est à la fois un ticket économique et un ticket technique. Cette situation crée un risque d'accroissement de l'écart entre les espèces majeures et mineures, situation préjudiciable pour la diversité des acteurs économiques et la diversité biologique cultivée (inter- et intra-spécifique). Il convient donc de s'interroger sur les décisions à prendre et dispositifs à mettre en place pour que ceci ne se produise pas.

La question de la propriété intellectuelle est très prégnante dans la réflexion sur les NBTs. Aux instruments connus qui permettent d'octroyer une propriété intellectuelle à du matériel génétique sur la base de sa caractérisation phénotypique (COV sur variété), et à une technologie d'invention industrielle (brevet sur CRISPR/Cas), s'ajoute ici la possibilité de poser des brevets sur des gènes édités, qui est déjà utilisée. Le brevet sur le vivant est une des causes de la non-acceptabilité sociétale de certaines technologies d'amélioration des plantes (Bensaude-Vincent B, 2022). Au sein du Comité Scientifique du CTPS, différents points de vue ont été exprimés sur ce sujet, sans qu'un consensus ne puisse être établi. Ces différentes positions sont :

- Le Comité Scientifique du CTPS recommande que l'utilisation des brevets pour protéger des éditions du génome devra se faire dans le respect du cadre réglementaire et jurisprudentiel européen en vigueur actuellement, qui garantit l'articulation avec le COV et permet l'exemption du sélectionneur et le privilège de l'agriculteur
- Le Comité Scientifique du CTPS recommande un engagement collectif des obtenteurs de ne pas prendre de brevets sur les traits édités et de mobiliser le COV comme levier pour garantir la propriété intellectuelle et pour assurer un progrès génétique rapide au service de la transition agroécologique.

Enfin, l'utilisation des NBT dessine un nouveau contexte, qui sera marqué par des coûts. Ceux-ci peuvent être afférents à la création et la protection industrielle, à l'évaluation des services et disservices au moment de l'inscription ou encore à l'organisation des éléments nécessaires à la coexistence de filières NBT et NBT-free. Il conviendra de s'interroger sur les acteurs et composantes du système sociotechnique qui devront porter ces coûts. Ces coûts vont profondément modifier les modèles économiques des entreprises, pouvant conduire à la disparition de certaines entreprises de sélection, qui sont pourtant détentrices de fonds génétiques améliorés, mais aussi à l'émergence d'un certain nombre de sociétés de services apportant leur maîtrise des technologies. Ceci conduit de fait à s'interroger sur les valeurs économiques mais aussi agroécologiques et sociétales respectives d'une part de la diversité génétique existant à la fois dans les collections de ressources phylogénétiques et dans le matériel amélioré chez les obtenteurs et d'autre part d'un allèle nouveau (ou d'une combinaison d'allèles).

## Références bibliographiques

- Abe, K., Araki, E., Suzuki, Y., Toki, S., & Saika, H. (2018). Production of high oleic/low linoleic rice by genome editing. *Plant physiology and biochemistry: PPB*, 131, 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.033>
- Achary, V.M.M., Reddy, M.K. CRISPR-Cas9 mediated mutation in GRAIN WIDTH and WEIGHT2 (GW2) locus improves aleurone layer and grain nutritional quality in rice. *Sci Rep* 11, 21941 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00828-z>
- Adli M. 2018. "The CRISPR tool kit for genome editing and beyond" *Nature communication*. 2018. 9: 1911. doi:10.1038/s41467-018-04252-2
- Akama K, Akter N, Endo H, et al. An In Vivo Targeted Deletion of the Calmodulin-Binding Domain from Rice Glutamate Decarboxylase 3 (OsGAD3) Increases  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Content in Grains. *Rice (New York, N.Y.)*. 2020 Mar;13(1):20. DOI: 10.1186/s12284-020-00380-w. PMID: 32180062; PMCID: PMC7076103.
- Al Amin, N., Ahmad, N., Wu, N. et al. CRISPR-Cas9 mediated targeted disruption of FAD2–2 microsomal omega-6 desaturase in soybean (*Glycine max.L.*). *BMC Biotechnol* 19, 9 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0501-2>
- Alam, M. S., Kong, J., Tao, R., Ahmed, T., Alamin, M., Alotaibi, S. S., Abdelsalam, N. R., & Xu, J. H. (2022). CRISPR/Cas9 Mediated Knockout of the OsbHLH024 Transcription Factor Improves Salt Stress Resistance in Rice (*Oryza sativa L.*). *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(9), 1184. <https://doi.org/10.3390/plants11091184>
- Alfatih, A., Wu, J., Jan, S. U., Zhang, Z. S., Xia, J. Q., & Xiang, C. B. (2020). Loss of rice PARAQUAT TOLERANCE 3 confers enhanced resistance to abiotic stresses and increases grain yield in field. *Plant, cell & environment*, 43(11), 2743–2754. <https://doi.org/10.1111/pce.13856>
- ALLEA (2020) lead authors: Dima, O.; Bocken H.; Custers, R.; Inze, D.; Puigdomenech, P.; Genome Editing for Crop Improvement. Symposium summary. Berlin. DOI: 10.26356/gen-editing-cro
- An, Guanghui & Qi, Yetong & Zhang, Weiyi & Gao, Hairong & Qian, Jinlong & Larkin, Robert & Chen, Jiongjiong & Kuang, Hanhui. (2022). LsNRL4 enhances photosynthesis and decreases leaf angles in lettuce. *Plant Biotechnology Journal*. 10.1111/pbi.13878.
- Andersson M, Turesson H, Nicolia A, Fält AS, Samuelsson M, Hofvander P. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep*. 2017 Jan;36(1):117-128. doi: 10.1007/s00299-016-2062-3. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27699473; PMCID: PMC5206254.
- Anzalone, A.V., Gao, X.D., Podracky, C.J. *et al.* Programmable deletion, replacement, integration and inversion of large DNA sequences with twin prime editing. *Nat Biotechnol* 40, 731–740 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01133-w>
- Aquino-Jarquín, G., 2021. Current advances in overcoming obstacles of CRISPR/Cas9 off-target genome editing. *Molecular Genetics and Metabolism* 134, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.08.002>
- Article L611-19 - Code de la propriété intellectuelle - Légifrance (legifrance.gouv.fr)
- Arulganesh, T. & Kumam, Y. & Kumar, K.K. & Loganathan, Arul & Eswaran, Kokiladevi & Nakeeran, S. & Varanavasiappan, S. & Manonmani, S. & Sudhakar, Dwivedi. (2022). Genome editing of elite rice cultivar CO51 for bacterial leaf blight resistance. *Electronic Journal of Plant Breeding*. 12. 1060-1068. 10.37992/2021.1204.147.
- Ashokkumar S, Jaganathan D, Ramanathan V, Rahman H, Palaniswamy R, Kambale R, Muthurajan R. Creation of novel alleles of fragrance gene OsBADH2 in rice through CRISPR/Cas9 mediated gene editing. *PLoS One*. 2020 Aug 12;15(8):e0237018. doi: 10.1371/journal.pone.0237018. PMID: 32785241; PMCID: PMC7423090.
- Assou, J., Zhang, D., Roth, K., Steinke, S., Hust, M., Reinard, T., Winkelmann, T., & Boch, J. (2022). Removing the major allergen Bra j I from brown mustard (*Brassica juncea*) by CRISPR/Cas9. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 109(3), 649–663. <https://doi.org/10.1111/tpj.15584>
- Azameti, Mawuli K, and Wadzani Palnam Dauda. "Base Editing in Plants: Applications, Challenges, and Future Prospects." *Frontiers in plant science* vol. 12 664997. 27 Jul. 2021, doi:10.3389/fpls.2021.664997
- Azizi, P., Hanafi, M.M., Sahebi, M., Harikrishna, J.A., Taheri, S., Yassoralipour, A., Nasehi, A., Azizi, P., Hanafi, M.M., Sahebi, M., Harikrishna, J.A., Taheri, S., Yassoralipour, A., Nasehi, A., 2020. Epigenetic changes and their relationship to somaclonal variation: a need to monitor the micropropagation of plantation crops. *Functional Plant Biol*. 47, 508–523. <https://doi.org/10.1071/FP19077>

- Bacman, Sandra R., Siôn L. Williams, Milena Pinto, Susana Peralta, et Carlos T. Moraes. 2013. « Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs ». *Nature medicine* 19 (9): 1111-13. doi:10.1038/nm.3261.
- Bai, Mengyan & Yuan, Juehui & Kuang, Huaqin & Gong, Pingping & Li, Suning & Zhang, Zihui & Liu, Bo & Sun, Jiafeng & Yang, Maoxiang & Yang, Lan & Wang, Dong & Song, Shikui & Guan, Yuefeng. (2019). Generation of a Multiplex Mutagenesis Population via Pooled CRISPR-Cas9 in Soybean. *Plant Biotechnology Journal*. 18. 10.1111/pbi.13239.
- Bairu, M.W., Aremu, A.O., Van Staden, J., 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul* 63, 147–173. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9554-x>
- Bánfalvi Z, Csákvári E, Villányi V, Kondrák M. Generation of transgene-free PDS mutants in potato by Agrobacterium-mediated transformation. *BMC Biotechnol*. 2020 May 12;20(1):25. doi: 10.1186/s12896-020-00621-2. PMID: 32398038; PMCID: PMC7216596.
- Bang, S. W., Choi, S., Jin, X., Jung, S. E., Choi, J. W., Seo, J. S., & Kim, J. K. (2022). Transcriptional activation of rice CINNAMOYL-CoA REDUCTASE 10 by OsNAC5, contributes to drought tolerance by modulating lignin accumulation in roots. *Plant biotechnology journal*, 20(4), 736–747. <https://doi.org/10.1111/pbi.13752>
- Bao, A., Chen, H., Chen, L. et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmSPL9 genes alters plant architecture in soybean. *BMC Plant Biol* 19, 131 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1746-6>
- Bari, V.K., Nassar, J.A. & Aly, R. CRISPR/Cas9 mediated mutagenesis of MORE AXILLARY GROWTH 1 in tomato confers resistance to root parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca*. *Sci Rep* 11, 3905 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82897-8>
- Bari, V.K., Nassar, J.A., Kheredin, S.M. et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8 in tomato provides resistance against the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca*. *Sci Rep* 9, 11438 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47893-z>
- Basharat, Z., Novo, L., & Yasmin, A. (2018). Genome Editing Weds CRISPR: What Is in It for Phytoremediation?. *Plants (Basel, Switzerland)*, 7(3), 51. <https://doi.org/10.3390/plants7030051>
- Bauer-Panskus, A., Miyazaki, J., Kawall, K., Then, C., 2020. Risk assessment of genetically engineered plants that can persist and propagate in the environment. *Environmental Sciences Europe* 32, 32. <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00301-0>
- Baysal, C., He, W., Drapal, M., Villorquina, G., Medina, V., Capell, T., Khush, G. S., Zhu, C., Fraser, P. D., & Christou, P. (2020). Inactivation of rice starch branching enzyme IIb triggers broad and unexpected changes in metabolism by transcriptional reprogramming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(42), 26503–26512. <https://doi.org/10.1073/pnas.2014860117>
- Ben Shlush, I., Samach, A., Melamed-Bessudo, C., Ben-Tov, D., Dahan-Meir, T., Filler-Hayut, S., & Levy, A. A. (2020). CRISPR/Cas9 Induced Somatic Recombination at the CRTISO Locus in Tomato. *Genes*, 12(1), 59. <https://doi.org/10.3390/genes12010059>
- Bertheau, Yves. (2022). Advances in identifying GM plants. Toward the routine detection of "hidden" and "new" GMOs. 10.19103/AS.2021.0097.22.
- Bertier, L. D., Ron, M., Huo, H., Bradford, K. J., Britt, A. B., & Michelmore, R. W. (2018). High-Resolution Analysis of the Efficiency, Heritability, and Editing Outcomes of CRISPR/Cas9-Induced Modifications of NCED4 in Lettuce (*Lactuca sativa*). *G3 (Bethesda, Md.)*, 8(5), 1513–1521. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300396>
- Beyene, G., Chauhan, R. D., Villmer, J., Husic, N., Wang, N., Gebre, E., Girma, D., Chanyalew, S., Assefa, K., Tabor, G., Gehan, M., McGrone, M., Yang, M., Lenderts, B., Schwartz, C., Gao, H., Gordon-Kamm, W., Taylor, N. J., & MacKenzie, D. J. (2022). CRISPR/Cas9-mediated tetra-allelic mutation of the 'Green Revolution' SEMIDWARF-1 (SD-1) gene confers lodging resistance in tef (*Eragrostis tef*). *Plant biotechnology journal*, 10.1111/pbi.13842. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/pbi.13842>
- Beying N, Schmidt C, Pacher M, Houben A, Puchta H. CRISPR-Cas9-mediated induction of heritable chromosomal translocations in Arabidopsis. *Nat Plants*. 2020 Jun;6(6):638-645. doi: 10.1038/s41477-020-0663-x. Epub 2020 May 25. PMID: 32451449.
- Biesiekierski J. R. (2017). What is gluten?. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 32 Suppl 1, 78–81. <https://doi.org/10.1111/jgh.13703>
- Bouzroud, S., Gasparini, K., Hu, G., Barbosa, M., Rosa, B. L., Fahr, M., Bendaou, N., Bouzayen, M., Zsögön, A., Smouni, A., & Zouine, M. (2020). Down Regulation and Loss of Auxin Response Factor 4 Function Using CRISPR/Cas9 Alters Plant Growth, Stomatal Function and Improves Tomato



- Tolerance to Salinity and Osmotic Stress. *Genes*, 11(3), 272. <https://doi.org/10.3390/genes11030272>
- Braatz, J., Harloff, H. J., Mascher, M., Stein, N., Himmelbach, A., & Jung, C. (2017). CRISPR-Cas9 Targeted Mutagenesis Leads to Simultaneous Modification of Different Homoeologous Gene Copies in Polyploid Oilseed Rape (*Brassica napus*). *Plant physiology*, 174(2), 935–942. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00426>
- Brant, E. J., Baloglu, M. C., Parikh, A., & Altpeter, F. (2021). CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis of *LIGULELESS-1* in sorghum provides a rapidly scorable phenotype by altering leaf inclination angle. *Biotechnology journal*, 16(11), e2100237. <https://doi.org/10.1002/biot.202100237>
- Brauer, E. K., Balcerzak, M., Rocheleau, H., Leung, W., Schernthaner, J., Subramaniam, R., & Ouellet, T. (2020). Genome Editing of a Deoxynivalenol-Induced Transcription Factor Confers Resistance to *Fusarium graminearum* in Wheat. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 33(3), 553–560. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-19-0332-R>
- Brouns F. (2021). Phytic Acid and Whole Grains for Health Controversy. *Nutrients*, 14(1), 25. <https://doi.org/10.3390/nu14010025>
- Bürger, J., Darmency, H., Granger, S., Guyot, S.H.M., Messéan, A., Colbach, N., 2015. Simulation study of the impact of changed cropping practices in conventional and GM maize on weeds and associated biodiversity. *Agricultural Systems* 137, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2015.03.009>
- Bull SE, Seung D, Chanez C, Mehta D, Kuon JE, Truernit E, Hochmuth A, Zurkirchen I, Zeeman SC, Gruissem W, Vanderschuren H. Accelerated ex situ breeding of GBSS- and PTST1-edited cassava for modified starch. *Sci Adv*. 2018 Sep 5;4(9):eaat6086. doi: 10.1126/sciadv.aat6086. PMID: 30191180; PMCID: PMC6124905.
- Burner, N., Kernodle, S.P., Steede, T. et al. Editing of *A622* genes results in ultra-low nicotine whole tobacco plants at the expense of dramatically reduced growth and development. *Mol Breeding* 42, 20 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11032-022-01293-w>
- Butt, H., Jamil, M., Wang, J. Y., Al-Babili, S., & Mahfouz, M. (2018). Engineering plant architecture via CRISPR/Cas9-mediated alteration of strigolactone biosynthesis. *BMC plant biology*, 18(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1387-1>
- Cai, Y., Chen, L., Liu, X., Guo, C., Sun, S., Wu, C., Jiang, B., Han, T., & Hou, W. (2018). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmFT2a* delays flowering time in soya bean. *Plant biotechnology journal*, 16(1), 176–185. <https://doi.org/10.1111/pbi.12758>
- Cai, Y.; Wang, L.; Chen, L.; Wu, T.; Liu, L.; Sun, S.; Wu, C.; Yao, W.; Jiang, B.; Yuan, S.; et al. Mutagenesis of *GmFT2a* and *GmFT5a* Mediated by CRISPR/Cas9 Contributes for Expanding the Regional Adaptability of Soybean. *Plant Biotechnol. J.* 2020, 18, 298–309.
- Cai, Z., Xian, P., Cheng, Y., Ma, Q., Lian, T., Nian, H., & Ge, L. (2021). CRISPR/Cas9-mediated gene editing of *GmJAGGED1* increased yield in the low-latitude soybean variety Huachun 6. *Plant biotechnology journal*, 19(10), 1898–1900. <https://doi.org/10.1111/pbi.13673>
- Caine RS, Yin X, Sloan J, Harrison EL, Mohammed U, Fulton T, Biswal AK, Dionora J, Chater CC, Coe RA, Bandyopadhyay A, Murchie EH, Swarup R, Quick WP, Gray JE. Rice with reduced stomatal density conserves water and has improved drought tolerance under future climate conditions. *New Phytol.* 2019 Jan;221(1):371-384. doi: 10.1111/nph.15344. Epub 2018 Jul 24. PMID: 30043395; PMCID: PMC6492113.
- Camas, R., Rivera-Solís, G., Duarte, F., De la Peña, C., 2014. *In vitro* culture: An epigenetic challenge for plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 118, 187–201. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0482-8>
- Camerlengo francesco, Frittelli Arianna and Pagliarello riccardo, 2022. "CRISPR towards a sustainable Agriculture". *Encyclopedia*, 2, 538-558. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010036>.
- Camerlengo, Francesco & Frittelli, Arianna & Sparks, Caroline & Doherty, Angela & Martignago, Damiano & Larre, Colette & Lupi, Roberta & Sestili, Francesco & Masci, Stefania. (2020). CRISPR-Cas9 Multiplex Editing of the  $\alpha$ -Amylase/Trypsin Inhibitor Genes to Reduce Allergen Proteins in Durum Wheat. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 4. 10.3389/fsufs.2020.00104.
- Cano-Rodriguez D, Gjaltema RA, Jilderda LJ, Jellema P, Dokter-Fokkens J, Ruiters MH, Rots MG. Writing of H3K4Me3 overcomes epigenetic silencing in a sustained but context-dependent manner. *Nat Commun.* 2016 Aug 10;7:12284. doi: 10.1038/ncomms12284. PMID: 27506838; PMCID: PMC4987519.
- Catherine Regnault-Roger (2020) Des plantes biotech au service de la santé du végétal et de l'environnement, Fondation pour l'innovation politique, janvier 2020, 56 pages
- Čermák, T., Baltés, N.J., Čegan, R. et al. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol* 16, 232 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0796-9>

- Chandrasekaran, J., Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., Pearlsman, M., Sherman, A., Arazi, T., & Gal-On, A. (2016). Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Molecular plant pathology*, 17(7), 1140–1153. <https://doi.org/10.1111/mpp.12375>
- Charpentier, Emmanuelle, et Jennifer A. Doudna. 2013. « Biotechnology: Rewriting a Genome ». *Nature* 495 (7439): 50-51. doi:10.1038/495050a
- Charrier, A., Vergne, E., Dousset, N., Richer, A., Petiteau, A., & Chevreau, E. (2019). Efficient Targeted Mutagenesis in Apple and First Time Edition of Pear Using the CRISPR-Cas9 System. *Frontiers in plant science*, 10, 40. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00040>
- Chen, Huamei & Ye, Rong & Liang, Ying & Shuchang, Zhang & Liu, Xiulian & Sun, Chongjun & Li, Fangbai & Yi, Jicai. (2022). Generation of low-cadmium rice germplasms via knockout of OsLCD using CRISPR/Cas9. *Journal of Environmental Sciences*. 126. 10.1016/j.jes.2022.05.047.
- Chen Kuling, wang Yanpeng, Zhang Rui, Zhang Huawei and Gao Caixia, 2019. "CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture". *Annual reviews of Plant biology*. 2019. 70:667-697. [WWW.annualreviews.org](http://WWW.annualreviews.org)
- Chen L., Yang, H., Fang, Y., Guo, W., Chen, H., Zhang, X., Dai, W., Chen, S., Hao, Q., Yuan, S., Zhang, C., Huang, Y., Shan, Z., Yang, Z., Qiu, D., Liu, X., Tran, L. P., Zhou, X., & Cao, D. (2021). Overexpression of GmMYB14 improves high-density yield and drought tolerance of soybean through regulating plant architecture mediated by the brassinosteroid pathway. *Plant biotechnology journal*, 19(4), 702–716. <https://doi.org/10.1111/pbi.13496>
- Chen Y, Fu M, Li H, Wang L, Liu R, Liu Z, Zhang X, Jin S. High-oleic acid content, nontransgenic allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) generated by knockout of GhFAD2 genes with CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotechnol J*. 2021 Mar;19(3):424-426. doi: 10.1111/pbi.13507. Epub 2020 Dec 29. PMID: 33131175; PMCID: PMC7955888.
- Chen, Z., Ke, W., He, F., Chai, L., Cheng, X., Xu, H., Wang, X., Du, D., Zhao, Y., Chen, X., Xing, J., Xin, M., Guo, W., Hu, Z., Su, Z., Liu, J., Peng, H., Yao, Y., Sun, Q., & Ni, Z. (2022). A single nucleotide deletion in the third exon of FT-D1 increases the spikelet number and delays heading date in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant biotechnology journal*, 20(5), 920–933. <https://doi.org/10.1111/pbi.13773>
- Choi J, Chen W, Suiter CC, Lee C, Chardon FM, Yang W, Leith A, Daza RM, Martin B, Shendure J. Precise genomic deletions using paired prime editing. *Nat Biotechnol*. 2022 Feb;40(2):218-226. doi: 10.1038/s41587-021-01025-z. Epub 2021 Oct 14. PMID: 34650269; PMCID: PMC8847327.
- Choi S.H., Ahn, W.S., Jie, E.Y. et al. Development of late-bolting plants by CRISPR/Cas9-mediated genome editing from mesophyll protoplasts of lettuce. *Plant Cell Rep* 41, 1627–1630 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02875-w>
- Coburn B, Sekirov I, Finlay BB. Type III secretion systems and disease. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Oct;20(4):535-49. doi: 10.1128/CMR.00013-07. PMID: 17934073; PMCID: PMC2176049.
- Collias, Daphne and Chase L. Beisel. "CRISPR technologies and the search for the PAM-free nuclease." *Nature Communications*. 2021. 12:555. DOI:10.1038/s41467-020-20633-y
- Connorton, J. M., Jones, E. R., Rodríguez-Ramiro, I., Fairweather-Tait, S., Uauy, C., & Balk, J. (2017). Wheat Vacuolar Iron Transporter TaVIT2 Transports Fe and Mn and Is Effective for Biofortification. *Plant physiology*, 174(4), 2434–2444. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00672>
- Cui Y, Hu X, Liang G, Feng A, Wang F, Ruan S, Dong G, Shen L, Zhang B, Chen D, Zhu L, Hu J, Lin Y, Guo L, Matsuoka M, Qian Q. Production of novel beneficial alleles of a rice yield-related QTL by CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J*. 2020 Mar 1;18(10):1987–9. doi: 10.1111/pbi.13370. Epub ahead of print. PMID: 32115804; PMCID: PMC7540660.
- Curtin SJ, Xiong Y, Michno JM, Campbell BW, Stec AO, Čermák T, Starker C, Voytas DF, Eamens AL, Stupar RM. CRISPR/Cas9 and TALENs generate heritable mutations for genes involved in small RNA processing of *Glycine max* and *Medicago truncatula*. *Plant Biotechnol J*. 2018 Jun;16(6):1125-1137. doi: 10.1111/pbi.12857. Epub 2017 Dec 4. PMID: 29087011; PMCID: PMC5978873.
- Dahan-Meir, T., Filler-Hayut, S., Melamed-Bessudo, C., Bocobza, S., Czosnek, H., Aharoni, A., & Levy, A. A. (2018). Efficient in planta gene targeting in tomato using geminiviral replicons and the CRISPR/Cas9 system. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 95(1), 5–16. <https://doi.org/10.1111/tpj.13932>
- Dan Ding , Kaiyuan Chen, Yuedan Chen, Hong Li, Kabin Xie "Engineering Introns to Express RNA Guides for Cas9- and Cpf1-Mediated Multiplex Genome Editing" VOLUME 11, ISSUE 4, P542-552, APRIL 02, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.02.005>
- Das Debajit , Singha Dhanawantari L., Paswan Ricky Raj, Chowdhury Naimisha, Sharma Monica, Reddy Palakolanu Sudhakar, Chikkaputtaiah Channakeshavaiah, 2022. "Recent advancements in CRISPR/Cas technology for accelerated crop improvement" *Planta*. 2022. 255:109.

- De Souza Moraes, T., van Es, S.W., Hernández-Pinzón, I. et al. The TCP transcription factor HvTB2 heterodimerizes with VRS5 and controls spike architecture in barley. *Plant Reprod* (2022). <https://doi.org/10.1007/s00497-022-00441-8>
- De Toledo Thomazella, Daniela & Brail, Quinton & Dahlbeck, Douglas & Staskawicz, Brian. (2016). CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. 10.1101/064824.
- Deng, L., Wang, H., Sun, C., Li, Q., Jiang, H., Du, M., Li, C. B., & Li, C. (2018). Efficient generation of pink-fruited tomatoes using CRISPR/Cas9 system. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, 45(1), 51–54. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2017.10.002>
- Do, P.T., Nguyen, C.X., Bui, H.T. et al. Demonstration of highly efficient dual gRNA CRISPR/Cas9 editing of the homeologous GmFAD2–1A and GmFAD2–1B genes to yield a high oleic, low linoleic and  $\alpha$ -linolenic acid phenotype in soybean. *BMC Plant Biol* 19, 311 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1906-8>
- Dong, O.X., Yu, S., Jain, R. et al. Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9. *Nat Commun* 11, 1178 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14981-y>
- Duan, YB., Li, J., Qin, RY. et al. Identification of a regulatory element responsible for salt induction of rice OsRAV2 through ex situ and in situ promoter analysis. *Plant Mol Biol* 90, 49–62 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0393-z>
- EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms), 2014. Scientific Opinion on the use of existing environmental surveillance networks to support the post-market environmental monitoring of genetically modified plants. *EFSA Journal* 2014;12(11):3883, 24 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3883
- Endo, A., Saika, H., Takemura, M. et al. A novel approach to carotenoid accumulation in rice callus by mimicking the cauliflower Orange mutation via genome editing. *Rice* 12, 81 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0345-3>
- European Network of GMO Laboratories (ENGL), Detection of food and feed plant products obtained by new mutagenesis techniques, 26 March 2019 (JRC116289)
- Fan, S., Zhang, L., Tang, M., Cai, Y., Liu, J., Liu, H., Liu, J., Terzaghi, W., Wang, H., Hua, W., & Zheng, M. (2021). CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the BnaA03.BP gene confers semi-dwarf and compact architecture to rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant biotechnology journal*, 19(12), 2383–2385. <https://doi.org/10.1111/pbi.13703>
- Fasani, E., Manara, A., Martini, F., Furini, A., & DalCorso, G. (2018). The potential of genetic engineering of plants for the remediation of soils contaminated with heavy metals. *Plant, cell & environment*, 41(5), 1201–1232. <https://doi.org/10.1111/pce.12963>
- Fister, A. S., Landherr, L., Maximova, S. N., & Guiltinan, M. J. (2018). Transient Expression of CRISPR/Cas9 Machinery Targeting TcNPR3 Enhances Defense Response in *Theobroma cacao*. *Frontiers in plant science*, 9, 268. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00268>
- Fladung, Matthias. (2021). Targeted CRISPR/Cas9-Based Knock-Out of the Rice Orthologs TILLER ANGLE CONTROL 1 (TAC1) in Poplar Induces Erect Leaf Habit and Shoot Growth. *Forests*. 12. 1615. 10.3390/f12121615.
- Galli, M., Hochstein, S., Iqbal, D. et al. CRISPR/SpCas9-mediated KO of epigenetically active MORC proteins increases barley resistance to *Bipolaris* spot blotch and *Fusarium* root rot. *J Plant Dis Prot* 129, 1005–1011 (2022). <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00574-y>
- Gao, H., Gadlage, M. J., Lafitte, H. R., Lenderts, B., Yang, M., Schroder, M., Farrell, J., Snopek, K., Peterson, D., Feigenbutz, L., Jones, S., St Clair, G., Rahe, M., Sanyour-Doyel, N., Peng, C., Wang, L., Young, J. K., Beatty, M., Dahlke, B., Hazebroek, J., ... Meeley, R. B. (2020). Superior field performance of waxy corn engineered using CRISPR-Cas9. *Nature biotechnology*, 38(5), 579–581. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0444-0>
- Gao, J., Zhang, T., Xu, B., Jia, L., Xiao, B., Liu, H., Liu, L., Yan, H., & Xia, Q. (2018). CRISPR/Cas9-Mediated Mutagenesis of Carotenoid Cleavage Dioxygenase 8 (CCD8) in Tobacco Affects Shoot and Root Architecture. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1062. <https://doi.org/10.3390/ijms19041062>
- Gao, Q., Luo, H., Li, Y., Liu, Z., & Kang, C. (2020). Genetic modulation of RAP alters fruit coloration in both wild and cultivated strawberry. *Plant biotechnology journal*, 18(7), 1550–1561. <https://doi.org/10.1111/pbi.13317>
- Gao, Y., Yang, J., Duan, W. et al. NtRAV4 negatively regulates drought tolerance in *Nicotiana tabacum* by enhancing antioxidant capacity and defence system. *Plant Cell Rep* (2022). <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02896-5>

- García Pedro, María Caparrós, Lao Teresa. (2018) The effects of salt stress on ornamental plants and integrative cultivation practices. *Scientia Horticulturae* Volume 240, 20 October 2018, Pages 430-439. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.022>"
- Gendre Mélodie (2016) NBT et Techniques d'édition du génome : Impacts potentiels sur l'offre variétale et les activités du CTPS.
- Gho, Y. S., Choi, H., Moon, S., Kim, S. R., Ha, S. H., & Jung, K. H. (2022). Tissue-specific enhancement of OsRNS1 with root-preferred expression is required for the increase of crop yield. *Journal of advanced research*, S2090-1232(22)00119-9. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.05.007>
- Ghorbani Faal, P., Farsi, M., Seifi, A., & Mirshamsi Kakhki, A. (2020). Virus-induced CRISPR-Cas9 system improved resistance against tomato yellow leaf curl virus. *Molecular biology reports*, 47(5), 3369–3376. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05409-3>
- Ghosh, A., Igamberdiev, A.U., Debnath, S.C., 2021. Tissue culture-induced DNA methylation in crop plants: a review. *Mol Biol Rep* 48, 823–841. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06062-6>
- Gomez, M. A., Lin, Z. D., Moll, T., Chauhan, R. D., Hayden, L., Renninger, K., Beyene, G., Taylor, N. J., Carrington, J. C., Staskawicz, B. J., & Bart, R. S. (2019). Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava eIF4E isoforms nCBP-1 and nCBP-2 reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence. *Plant biotechnology journal*, 17(2), 421–434. <https://doi.org/10.1111/pbi.12987>
- Gomez, Michael & Berkoff, Kodiak & Gill, Baljeet & Iavarone, Anthony & Lieberman, Samantha & Ma, Jessica & Schultink, Alex & Wyman, Stacia & Chauhan, Raj & Taylor, Nigel & Staskawicz, Brian & Cho, Myeong-Je & Rokhsar, Daniel & Lyons, Jessica. (2021). CRISPR-Cas9-mediated knockout of CYP79D1 and CYP79D2 in cassava attenuates toxic cyanogen production. 10.1101/2021.10.08.462827.
- González, M. N., Massa, G. A., Andersson, M., Turesson, H., Olsson, N., Fält, A. S., Storani, L., Décima Oneto, C. A., Hofvander, P., & Feingold, S. E. (2020). Reduced Enzymatic Browning in Potato Tubers by Specific Editing of a Polyphenol Oxidase Gene via Ribonucleoprotein Complexes Delivery of the CRISPR/Cas9 System. *Frontiers in plant science*, 10, 1649. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01649>
- Gouleau A., Gauffreteau A., This P., Tailliez D., Gombert J., Gouache D., Bakan B., Cordeau S., Enjalbert J., Laperche A., Leclère V., Leyronas C., Lheureux F., Mazza V., Moquet F., Wagner A., Bernicot M.H., Fontaine L., Bertoux V., Huyghe C. 2021. Saisine du Comité Scientifique CTPS : Quelles Variétés pour l'agroécologie?.
- Guan H, Chen X, Wang K, Liu X, Zhang D, Li Y, Song Y, Shi Y, Wang T, Li C, Li Y. Genetic Variation in ZmPAT7 Contributes to Tassel Branch Number in Maize. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 26;23(5):2586. doi: 10.3390/ijms23052586. PMID: 35269730; PMCID: PMC8910302.
- Gumtow, R., Wu, D., Uchida, J., & Tian, M. (2018). A Phytophthora palmivora Extracellular Cystatin-Like Protease Inhibitor Targets Papain to Contribute to Virulence on Papaya. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI, 31(3), 363–373. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0131-FI>
- Guo, X., Fu, Y., Lee, Y. J., Chern, M., Li, M., Cheng, M., Dong, H., Yuan, Z., Gui, L., Yin, J., Qing, H., Zhang, C., Pu, Z., Liu, Y., Li, W., Li, W., Qi, P., Chen, G., Jiang, Q., Ma, J., ... Wang, J. (2022). The PGS1 basic helix-loop-helix protein regulates Fl3 to impact seed growth and grain yield in cereals. *Plant biotechnology journal*, 20(7), 1311–1326. <https://doi.org/10.1111/pbi.13809>
- Guolong, Yu & Zou, Jianan & Wang, Jinhui & Zhu, Rongsheng & Qi, Zhao-ming & Jiang, Hongwei & Hu, Zhenbang & Yang, Mingliang & Zhao, Ying & Wu, Xiaoxia & Liu, Chunyan & Li, Candong & Yang, Xue & Zhu, Zhendong & Chen, Qingshan & Fu, Yong-Fu & Xin, Dawei. (2021). A soybean NAC homolog contributes to resistance to Phytophthora sojae mediated by dirigent proteins. *The Crop Journal*. 10. 10.1016/j.cj.2021.08.009.
- Han, Xiaoli & Chen, Zhijun & Li, Peide & Xu, Huashan & Liu, Kai & Zha, Wenjun & Li, Sanhe & Chen, Junxiao & Yang, Guocai & Huang, Jianliang & You, Aiqing & Zhou, Lei. (2022). Development of Novel Rice Germplasm for Salt-Tolerance Seedling Stage Using CRISPR-Cas9. *Sustainability*. 14. 2621. 10.3390/su14052621.
- Han, Y., Teng, K., Nawaz, G. et al. Generation of semi-dwarf rice (*Oryza sativa* L.) lines by CRISPR/Cas9-directed mutagenesis of OsGA20ox2 and proteomic analysis of unveiled changes caused by mutations . *3 Biotech* 9, 387 (2019). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1919-x>
- He, G., Du, Z., Xu, Z. et al. Genome sequencing and genetic analysis of recombinant inbred lines reveals important agronomic traits related loci under different nitrogen fertilization. *Mol Biol Rep* 49, 4545–4553 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07298-0>

- He, Li & Xiufeng, Li & Yang, Xu & Hualong, Liu & Mingliang, He & Xiaojie, Tian & Zhenyu, Wang & Xiuju, Wu & Qingyun, Bu & Jie, Yang. (2020). High-Efficiency Reduction of Rice Amylose Content via CRISPR/Cas9-Mediated Base Editing. *Rice Science*. 27. 445-448. 10.1016/j.rsci.2020.09.001.
- Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol*. 2015 May;33(5):510-7. doi: 10.1038/nbt.3199. Epub 2015 Apr 6. PMID: 25849900; PMCID: PMC4430400.
- Hong, Y., Meng, J., He, X., Zhang, Y., Liu, Y., Zhang, C., Qi, H., & Luan, Y. (2021). Editing miR482b and miR482c Simultaneously by CRISPR/Cas9 Enhanced Tomato Resistance to *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 111(6), 1008–1016. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-20-0360-R>
- Honma, Y., Adhikari, P. B., Kuwata, K., Kagenishi, T., Yokawa, K., Notaguchi, M., Kurotani, K., Toda, E., Bessho-Uehara, K., Liu, X., Zhu, S., Wu, X., & Kasahara, R. D. (2020). High-quality sugar production by *osgcs1* rice. *Communications biology*, 3(1), 617. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01329-x>
- Hsieh-Feng, Vicki and Yinong Yang. "Efficient expression of multiple guide RNAs for CRISPR/Cas genome editing." (2020). DOI:10.1007/s42994-019-00014-w
- Hu, B., Li, D., Liu, X., Qi, J., Gao, D., Zhao, S., Huang, S., Sun, J., & Yang, L. (2017). Engineering Non-transgenic Gynoecious Cucumber Using an Improved Transformation Protocol and Optimized CRISPR/Cas9 System. *Molecular plant*, 10(12), 1575–1578. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.09.005>
- Hu, D., Li, X., Yang, Z., Liu, S., Hao, D., Chao, M., Zhang, J., Yang, H., Su, X., Jiang, M., Lu, S., Zhang, D., Wang, L., Kan, G., Wang, H., Cheng, H., Wang, J., Huang, F., Tian, Z., & Yu, D. (2022). Downregulation of a gibberellin 3 $\beta$ -hydroxylase enhances photosynthesis and increases seed yield in soybean. *The New phytologist*, 235(2), 502–517. <https://doi.org/10.1111/nph.18153>
- Hu, G., Wang, K., Huang, B. et al. The auxin-responsive transcription factor SIDOF9 regulates inflorescence and flower development in tomato. *Nat. Plants* 8, 419–433 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01121-1>
- Hu, X., Cui, Y., Dong, G. et al. Using CRISPR-Cas9 to generate semi-dwarf rice lines in elite landraces. *Sci Rep* 9, 19096 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55757-9>
- Hu, Z., Lu, S. J., Wang, M. J., He, H., Sun, L., Wang, H., Liu, X. H., Jiang, L., Sun, J. L., Xin, X., Kong, W., Chu, C., Xue, H. W., Yang, J., Luo, X., & Liu, J. X. (2018). A Novel QTL qTGW3 Encodes the GSK3/SHAGGY-Like Kinase OsGSK5/OsSK41 that Interacts with OsARF4 to Negatively Regulate Grain Size and Weight in Rice. *Molecular plant*, 11(5), 736–749. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.03.005>
- Huang L, Li Q, Zhang C, Chu R, Gu Z, Tan H, Zhao D, Fan X, Liu Q. Creating novel Wx alleles with fine-tuned amylose levels and improved grain quality in rice by promoter editing using CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotechnol J*. 2020 Nov;18(11):2164-2166. doi: 10.1111/pbi.13391. Epub 2020 May 13. PMID: 32339389; PMCID: PMC7589223.
- Huang, C., Sun, H., Xu, D., Chen, Q., Liang, Y., Wang, X., Xu, G., Tian, J., Wang, C., Li, D., Wu, L., Yang, X., Jin, W., Doebley, J. F., & Tian, F. (2018). ZmCCT9 enhances maize adaptation to higher latitudes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(2), E334–E341. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718058115>
- Huang, H., Cui, T., Zhang, L., Yang, Q., Yang, Y., Xie, K., Fan, C., & Zhou, Y. (2020). Modifications of fatty acid profile through targeted mutation at *BnaFAD2* gene with CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Brassica napus*. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 133(8), 2401–2411. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03607-y>
- Huang, L & Zhang, R & Huang, G. & Li, Y. & Melaku, G. & Zhang, S. & Chen, H. & Zhao, Y. & Zhang, J. & Zhang, Y. & Fengyi, H. (2018). Developing superior alleles of yield genes in rice by artificial mutagenesis using the CRISPR/Cas9 system. *The Crop Journal*. 6. 10.1016/j.cj.2018.05.005.
- Hui, S., Li, H., Mawia, A. M., Zhou, L., Cai, J., Ahmad, S., Lai, C., Wang, J., Jiao, G., Xie, L., Shao, G., Sheng, Z., Tang, S., Wang, J., Wei, X., Hu, S., & Hu, P. (2022). Production of aromatic three-line hybrid rice using novel alleles of *BADH2*. *Plant biotechnology journal*, 20(1), 59–74. <https://doi.org/10.1111/pbi.13695>
- Iba K. (2002). Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual review of plant biology*, 53, 225–245. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100201.160729>
- Ibrahim S, Saleem B, Rehman N, Zafar SA, Naeem MK, Khan MR. CRISPR/Cas9 mediated disruption of Inositol Pentakisphosphate 2-Kinase 1 (TaIPK1) reduces phytic acid and improves iron and zinc accumulation in wheat grains. *J Adv Res*. 2021 Jul 14;37:33-41. doi: 10.1016/j.jare.2021.07.006. PMID: 35499048; PMCID: PMC9039650.

- Illouz-Eliaz, N., Nissan, I., Nir, I., Ramon, U., Shohat, H., & Weiss, D. (2020). Mutations in the tomato gibberellin receptors suppress xylem proliferation and reduce water loss under water-deficit conditions. *Journal of experimental botany*, 71(12), 3603–3612. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa137>
- Ito, Y., Nishizawa-Yokoi, A., Endo, M., Mikami, M., & Toki, S. (2015). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochemical and biophysical research communications*, 467(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.117>
- Jarvis, B. A., Romsdahl, T. B., McGinn, M. G., Nazarenus, T. J., Cahoon, E. B., Chapman, K. D., & Sedbrook, J. C. (2021). CRISPR/Cas9-Induced fad2 and rod1 Mutations Stacked With fae1 Confer High Oleic Acid Seed Oil in Pennycress (*Thlaspi arvense* L.). *Frontiers in plant science*, 12, 652319. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.652319>
- Jeon JE, Kim JG, Fischer CR, Mehta N, Dufour-Schroif C, Wemmer K, Mudgett MB, Sattely E. A Pathogen-Responsive Gene Cluster for Highly Modified Fatty Acids in Tomato. *Cell*. 2020 Jan 9;180(1):176-187.e19. doi: 10.1016/j.cell.2019.11.037. PMID: 31923394; PMCID: PMC6956849.
- Jeon, J. E., Kim, J. G., Fischer, C. R., Mehta, N., Dufour-Schroif, C., Wemmer, K., Mudgett, M. B., & Sattely, E. (2020). A Pathogen-Responsive Gene Cluster for Highly Modified Fatty Acids in Tomato. *Cell*, 180(1), 176–187.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.037>
- Ji, R., Xu, X., Liu, J., Zhao, T., Li, H., Zhai, J., & Liu, B. (2022). Induced Mutation in GmCOP1b Enhances the Performance of Soybean under Dense Planting Conditions. *International journal of molecular sciences*, 23(10), 5394. <https://doi.org/10.3390/ijms23105394>
- Ji, X., Zhang, H., Zhang, Y. et al. Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. *Nature Plants* 1, 15144 (2015). <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.144>
- Jia, H., Yin, Z., Xuan, D., Lian, W., Han, D., Zhu, Z., Li, C., Li, C., & Song, Z. (2022). Mutation of NtNRAMP3 improves cadmium tolerance and its accumulation in tobacco leaves by regulating the subcellular distribution of cadmium. *Journal of hazardous materials*, 432, 128701. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128701>
- Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res*. 2013 Nov;41(20):e188. doi: 10.1093/nar/gkt780. Epub 2013 Sep 2. PMID: 23999092; PMCID: PMC3814374.
- Jiang, L., Li, D., Jin, L., Ruan, Y., Shen, W. H., & Liu, C. (2018). Histone lysine methyltransferases BnaSDG8.A and BnaSDG8.C are involved in the floral transition in Brassica napus. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 10.1111/tpj.13978. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/tpj.13978>
- Jiang, W. Z., Henry, I. M., Lynagh, P. G., Comai, L., Cahoon, E. B., & Weeks, D. P. (2017). Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, Camelina sativa, using CRISPR/Cas9 gene editing. *Plant biotechnology journal*, 15(5), 648–657. <https://doi.org/10.1111/pbi.12663>
- Jin, S., Gao, Q., Gao, C., 2021. An unbiased method for evaluating the genome-wide specificity of base editors in rice. *Nat Protoc* 16, 431–457. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00423-y>
- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A. Doudna, et Emmanuelle Charpentier. 2012. « A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity ». *Science* 337 (6096): 816-21. doi:10.1126/science.1225829.
- Jo, Areum, Sangwoo Ham, Gum Hwa Lee, Yun-II Lee, SangSeong Kim, Yun-Song Lee, Joo-Ho Shin, et al. 2015. « Efficient Mitochondrial Genome Editing by CRISPR/Cas9, Efficient Mitochondrial Genome Editing by CRISPR/Cas9 ». *BioMed Research International*, BioMed Research International 2015, 2015 (septembre): e305716. doi:10.1155/2015/305716, 10.1155/2015/305716.
- Jung, Y.J., Lee, H.J., Bae, S. et al. Acquisition of seed dormancy breaking in rice (*Oryza sativa* L.) via CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of OsVP1 gene. *Plant Biotechnol Rep* 13, 511–520 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00580-x>
- Karavolias, N.G., Horner, W., Abugu, M.N., & Evanega, S.N. (2021). Application of Gene Editing for Climate Change in Agriculture. *Frontiers in Sustainable Food Systems*.
- Karunarathne, S. D., Han, Y., Zhang, X. Q., & Li, C. (2022). CRISPR/Cas9 gene editing and natural variation analysis demonstrate the potential for HvARE1 in improvement of nitrogen use efficiency in barley. *Journal of integrative plant biology*, 64(3), 756–770. <https://doi.org/10.1111/jipb.13214>
- Kaur, N., Alok, A., Shivani et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient editing in phytoene desaturase (PDS) demonstrates precise manipulation in banana cv. Rasthali genome. *Funct Integr Genomics* 18, 89–99 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10142-017-0577-5>
- Kaur, N., Alok, A., Shivani, Kumar, P., Kaur, N., Awasthi, P., Chaturvedi, S., Pandey, P., Pandey, A., Pandey, A. K., & Tiwari, S. (2020). CRISPR/Cas9 directed editing of lycopene epsilon-cyclase

- modulates metabolic flux for  $\beta$ -carotene biosynthesis in banana fruit. *Metabolic engineering*, 59, 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.01.008>
- Kawaguchi, K., Takei-Hoshi, R., Yoshikawa, I. et al. Functional disruption of cell wall invertase inhibitor by genome editing increases sugar content of tomato fruit without decrease fruit weight. *Sci Rep* 11, 21534 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00966-4>
- Kearns NA, Pham H, Tabak B, Genga RM, Silverstein NJ, Garber M, Maehr R. Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion. *Nat Methods*. 2015 May;12(5):401-403. doi: 10.1038/nmeth.3325. Epub 2015 Mar 16. PMID: 25775043; PMCID: PMC4414811.
- Kelliher, T., Starr, D., Su, X., Tang, G., Chen, Z., Carter, J., Wittich, P. E., Dong, S., Green, J., Burch, E., McCuiston, J., Gu, W., Sun, Y., Strebe, T., Roberts, J., Bate, N. J., & Que, Q. (2019). One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction. *Nature biotechnology*, 37(3), 287–292. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0038-x>
- Khan, M., Basnet, R., Ahmed, S., Bao, J., & Shu, Q. (2020). Mutations of OsPLD $\alpha$ 1 Increase Lysophospholipid Content and Enhance Cooking and Eating Quality in Rice. *Plants* (Basel, Switzerland), 9(3), 390. <https://doi.org/10.3390/plants9030390>
- Khan, M., Basnet, R., Islam, S. A., & Shu, Q. (2019). Mutational Analysis of OsPLD $\alpha$ 1 Reveals Its Involvement in Phytic Acid Biosynthesis in Rice Grains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(41), 11436–11443. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05052>
- Kieu, N.P., Lenman, M., Wang, E.S. et al. Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes. *Sci Rep* 11, 4487 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83972-w>
- Kim, C. Y.(A), Park, J. Y., Choi, G., Kim, S., Vo, K., Jeon, J. S., Kang, S., & Lee, Y. H. (2022). A rice gene encoding glycosyl hydrolase plays contrasting roles in immunity depending on the type of pathogens. *Molecular plant pathology*, 23(3), 400–416. <https://doi.org/10.1111/mpp.13167>
- Kim, C. Y.(B) & Ahn, W. & Cha, A. & Jie, E. & Kim, S. & Hwang, B.H. & Lee, S. (2022). Development of glucoraphanin-rich broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) by CRISPR/Cas9-mediated DNA-free BolMYB28 editing. *Plant Biotechnology Reports*. 16. 10.1007/s11816-021-00732-y.
- Kim, D., Alptekin, B. & Budak, H. CRISPR/Cas9 genome editing in wheat. *Funct Integr Genomics* 18, 31–41 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10142-017-0572-x>
- Kim, Hyongbum, et Jin-Soo Kim. 2014. « A guide to genome engineering with programmable nucleases ». *Nature Reviews Genetics* 15 (5): 321-34. doi:10.1038/nrg3686
- Kim, Somi & Kaang, Bong-Kiun. (2017). Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory. *Experimental & Molecular Medicine*. 49. e281. doi: 10.1038/emm.2016.140.
- Kirschner, G. K., Rosignoli, S., Guo, L., Vardanega, I., Imani, J., Altmüller, J., Milner, S. G., Balzano, R., Nagel, K. A., Pflugfelder, D., Forestan, C., Bovina, R., Koller, R., Stöcker, T. G., Mascher, M., Simmonds, J., Uauy, C., Schoof, H., Tuberosa, R., Salvi, S., ... Hochholdinger, F. (2021). ENHANCED GRAVITROPISM 2 encodes a STERILE ALPHA MOTIF-containing protein that controls root growth angle in barley and wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(35), e2101526118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2101526118>
- Kis A, Hamar É, Tholt G, Bán R, Havelda Z. Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley by employing CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotechnol J*. 2019 Jun;17(6):1004-1006. doi: 10.1111/pbi.13077. Epub 2019 Feb 5. PMID: 30633425; PMCID: PMC6523583.
- Kitomi, Y., Hanzawa, E., Kuya, N., Inoue, H., Hara, N., Kawai, S., Kanno, N., Endo, M., Sugimoto, K., Yamazaki, T., Sakamoto, S., Sentoku, N., Wu, J., Kanno, H., Mitsuda, N., Toriyama, K., Sato, T., & Uga, Y. (2020). Root angle modifications by the DRO1 homolog improve rice yields in saline paddy fields. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(35), 21242–21250. <https://doi.org/10.1073/pnas.2005911117>
- Klap, Chen & Yeshayahou, Ester & Bolger, Anthony & Arazi, Tzahi & Gupta, Suresh & Shabtai, Sara & Usadel, Björn & Salts, Y. & Barg, Rivka. (2016). Tomato facultative parthenocarpy results from SI AGAMOUS-LIKE 6 loss of function. *Plant Biotechnology Journal*. 15. 10.1111/pbi.12662.
- Klimek-Chodacka, M., Oleszkiewicz, T., Lowder, L.G. et al. Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing in carrot cells. *Plant Cell Rep* 37, 575–586 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2252-2>
- Korres N.E. , Norsworthy J.K., Burgos N.R., D.M. 2017. Oosterhuis, Temperature and drought impacts on rice production: An agronomic perspective regarding short- and long-term adaptation measures, *Water Resources and Rural Development*, Volume 9, Pages 12-27, ISSN 2212-6082, <https://doi.org/10.1016/j.wrr.2016.10.001>.
- Kravchik, M., Shnaider, Y., Abebie, B., Shtarkman, M., Kumari, R., Kumar, S., Leibman, D., Spiegelman, Z., & Gal-On, A. (2022). Knockout of SITOM1 and SITOM3 results in differential resistance to

- tobamovirus in tomato. *Molecular plant pathology*, 10.1111/mpp.13227. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/mpp.13227>
- Kumam, Y., Rajadurai, G., Kumar, K.K. et al. Genome editing of indica rice ASD16 for imparting resistance against rice tungro disease. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* (2022). <https://doi.org/10.1007/s13562-021-00765-y>
- Kumar K, Kumar M, Kim SR, Ryu H, Cho YG. Insights into genomics of salt stress response in rice. *Rice (N Y)*. 2013 Oct 28;6(1):27. doi: 10.1186/1939-8433-6-27. PMID: 24280112; PMCID: PMC4883734.
- Kurata Morito, Wolf Natalie K., Lahr Walker S, Weg Madison T., Kluesner Mitchell G., Lee Samantha, Hui Kai, Shiraiwa Masano, Webber Beau R., Moriarity Branden S. 2018. "Highly multiplexed genome engineering using CRISPR/Cas9 gRNA arrays." 2018. *Plos one*. 13(9):e0198714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198714>
- Kurniawati, Devi & Suharsono, NFN & Santoso, Tri. (2020). Editing of PCNA Gene by CRISPR/Cas9 Technology to Improve the Red Chili Resistance to Yellow Leaf Curl Disease. *Jurnal AgroBiogen*. 16. 79. 10.21082/jbio.v16n2.2020.p79-88.
- Kuroiwa, K., Thenault, C., Nogu , F., Perrot, L., Mazier, M., & Gallois, J. L. (2022). CRISPR-based knockout of eIF4E2 in a cherry tomato background successfully recapitulates resistance to pepper veinal mottle virus. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, 316, 111160. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111160>
- Kurt IC, Zhou R, Iyer S, et al. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells. *Nat Biotechnol.* 2021;39(1):41-46. doi:10.1038/s41587-020-0609-x
- Kwon DY, Zhao YT, Lamonica JM, Zhou Z. Locus-specific histone deacetylation using a synthetic CRISPR-Cas9-based HDAC. *Nat Commun.* 2017 May 12;8:15315. doi: 10.1038/ncomms15315. PMID: 28497787; PMCID: PMC5437308.
- Kwon, CT., Heo, J., Lemmon, Z.H. et al. Rapid customization of Solanaceae fruit crops for urban agriculture. *Nat Biotechnol* 38, 182–188 (2020). [Frontiers in genome editing. 2022. \(4\) doi : 10.3389/fgeed.2022.830178](https://doi.org/10.1038/s41587-019-0361-Laforest L.C. and Nadakuduti S. S., . 2022. )
- Larson MH, Gilbert LA, Wang X, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nat Protoc.* 2013 Nov;8(11):2180-96. doi: 10.1038/nprot.2013.132. Epub 2013 Oct 17. PMID: 24136345; PMCID: PMC3922765.
- Lawrenson, T., Shorinola, O., Stacey, N. et al. Induction of targeted, heritable mutations in barley and Brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biol* 16, 258 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0826-7>
- Le, H., Nguyen, N. H., Ta, D. T., Le, T., Bui, T. P., Le, N. T., Nguyen, C. X., Rolletschek, H., Stacey, G., Stacey, M. G., Pham, N. B., Do, P. T., & Chu, H. H. (2020). CRISPR/Cas9-Mediated Knockout of Galactinol Synthase-Encoding Genes Reduces Raffinose Family Oligosaccharide Levels in Soybean Seeds. *Frontiers in plant science*, 11, 612942. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.612942>
- Lee, J., Nonaka, S., Takayama, M., & Ezura, H. (2018). Utilization of a Genome-Edited Tomato (*Solanum lycopersicum*) with High Gamma Aminobutyric Acid Content in Hybrid Breeding. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(4), 963–971. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05171>
- Lee, K., Seo, P.J., 2018. Dynamic Epigenetic Changes during Plant Regeneration. *Trends Plant Science* 23, 235–247. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.11.009>
- Lee, S. K., Eom, J. S., Hwang, S. K., Shin, D., An, G., Okita, T. W., & Jeon, J. S. (2016). Plastidic phosphoglucomutase and ADP-glucose pyrophosphorylase mutants impair starch synthesis in rice pollen grains and cause male sterility. *Journal of experimental botany*, 67(18), 5557–5569. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw324>
- Lema, M., 2021. Regulatory Assessment of Off-Target Changes and Spurious DNA Insertions in Gene-Edited Organisms for Agri-Food Use. *Journal of Regulatory Science* 9, 1–15.
- Leva A, Rinaldi L.M.R., (2017). Somaclonal Variation. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition)*, Pages 468-473, ISBN 9780123948083, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00150-7>.
- Li, A., Jia, S., Yobi, A., Ge, Z., Sato, S. J., Zhang, C., Angelovici, R., Clemente, T. E., & Holding, D. R. (2018). Editing of an Alpha-Kafirin Gene Family Increases, Digestibility and Protein Quality in Sorghum. *Plant physiology*, 177(4), 1425–1438. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00200>
- Li H, Yu K, Amoo O, Yu Y, Guo M, Deng S, Li M, Hu L, Wang J, Fan C, Zhou Y. Site-Directed Mutagenesis of the Carotenoid Isomerase Gene BnaCRTISO Alters the Color of Petals and Leaves in Brassica napus L. *Front Plant Sci.* 2022 Feb 10;13:801456. doi: 10.3389/fpls.2022.801456. PMID: 35222464; PMCID: PMC8866652.
- Li, C., Nguyen, V., Liu, J. et al. Mutagenesis of seed storage protein genes in Soybean using CRISPR/Cas9. *BMC Res Notes* 12, 176 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4207-2>



- Li, J., Jiao, G., Sun, Y., Chen, J., Zhong, Y., Yan, L., Jiang, D., Ma, Y., & Xia, L. (2021). Modification of starch composition, structure and properties through editing of TaSBEL1a in both winter and spring wheat varieties by CRISPR/Cas9. *Plant biotechnology journal*, 19(5), 937–951. <https://doi.org/10.1111/pbi.13519>
- Li, J., Manghwar, H., Sun, L., Wang, P., Wang, G., Sheng, H., Zhang, J., Liu, H., Qin, L., Rui, H., Li, B., Lindsey, K., Daniell, H., Jin, S., Zhang, X., 2019. Whole genome sequencing reveals rare off-target mutations and considerable inherent genetic or/and somaclonal variations in CRISPR/Cas9-edited cotton plants. *Plant Biotechnology Journal* 17, 858–868. <https://doi.org/10.1111/pbi.13020>
- Li, J., Zhang, X., Sun, Y., Zhang, J., Du, W., Guo, X., Li, S., Zhao, Y., & Xia, L. (2018). Efficient allelic replacement in rice by gene editing: A case study of the NRT1.1B gene. *Journal of integrative plant biology*, 60(7), 536–540. <https://doi.org/10.1111/jipb.12650>
- Li, M., Guo, S., Zhang, J. et al. Sugar transporter VST1 knockout reduced aphid damage in watermelon. *Plant Cell Rep* 41, 277–279 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02797-z>
- Li, M., Li, X., Zhou, Z., Wu, P., Fang, M., Pan, X., Lin, Q., Luo, W., Wu, G., & Li, H. (2016). Reassessment of the Four Yield-related Genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in Rice Using a CRISPR/Cas9 System. *Frontiers in plant science*, 7, 377. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00377>
- Li, Q., Wu, G., Zhao, Y., Wang, B., Zhao, B., Kong, D., Wei, H., Chen, C., & Wang, H. (2020). CRISPR/Cas9-mediated knockout and overexpression studies reveal a role of maize phytochrome C in regulating flowering time and plant height. *Plant biotechnology journal*, 18(12), 2520–2532. <https://doi.org/10.1111/pbi.13429>
- Li, Q., Zhang, D., Chen, M., Liang, W., Wei, J., Qi, Y., & Yuan, Z. (2016). Development of japonica Photo-Sensitive Genic Male Sterile Rice Lines by Editing Carbon Starved Anther Using CRISPR/Cas9. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, 43(6), 415–419. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.04.011>
- Li, R., Li, R., Li, X., Fu, D., Zhu, B., Tian, H., Luo, Y., & Zhu, H. (2018). Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of  $\gamma$ -aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. *Plant biotechnology journal*, 16(2), 415–427. <https://doi.org/10.1111/pbi.12781>
- Li, S., Shen, L., Hu, P., Liu, Q., Zhu, X., Qian, Q., Wang, K., & Wang, Y. (2019). Developing disease-resistant thermosensitive male sterile rice by multiplex gene editing. *Journal of integrative plant biology*, 61(12), 1201–1205. <https://doi.org/10.1111/jipb.12774>
- Li, S., Liu, L., Sun, W., Zhou, X., Zhou, H., 2022. A large-scale genome and transcriptome sequencing analysis reveals the mutation landscapes induced by high-activity adenine base editors in plants. *Genome Biology* 23, 51. <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02618-w>
- Li, X., Wang, Y., Chen, S., Tian, H., Fu, D., Zhu, B., Luo, Y., & Zhu, H. (2018). Lycopene Is Enriched in Tomato Fruit by CRISPR/Cas9-Mediated Multiplex Genome Editing. *Frontiers in plant science*, 9, 559. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00559>
- Li, Y. & Liu, D. & Zong, Y. & Jiang, L. & Xi, X. & Cao, D. & Shen, Yuhui & Zhang, H. & Liu, Baolong. (2020). New D hordein alleles were created in barley using CRISPR/Cas9 genome editing. *Cereal Research Communications*. 48. 10.1007/s42976-020-00023-2.
- Li, Z. & Cheng, Q. & Gan, Z. & Hou, Z. & Zhang, Y. & Li, Y. & Li, H. & Nan, H. & Yang, C. & Chen, L. & Lu, S. & Shi, W. & Chen, L. & Wang, Y. & Fang, C. & Kong, L. & Su, T. & Li, S. & Kou, K. & Dong, L.. (2020). Multiplex CRISPR/Cas9-mediated knockout of soybean LNK2 advances flowering time. *The Crop Journal*. 9. 10.1016/j.cj.2020.09.005.
- Liang Y, Han Y, Wang C, Jiang C, Xu JR. Targeted Deletion of the USTA and UvSLT2 Genes Efficiently in *Ustilago violacea* With the CRISPR-Cas9 System. *Front Plant Sci*. 2018 May 24;9:699. doi: 10.3389/fpls.2018.00699. PMID: 29881395; PMCID: PMC5976777.
- Liao, Shanyue & Qin, Xuemei & Luo, Liang & Han, Yue & Wang, Xin & Usman, Babar & Nawaz, Gul & Zhao, Neng & Liu, Yaoguang & Li, Rongbai. (2019). CRISPR/Cas9-Induced Mutagenesis of Semi-Rolled Leaf1,2 Confers Curled Leaf Phenotype and Drought Tolerance by Influencing Protein Expression Patterns and ROS Scavenging in Rice (*Oryza sativa* L.). *Agronomy*. 9. 10.3390/agronomy9110728.
- Liao, Y., Ali, A., Xue, Z., Zhou, X., Ye, W., Guo, D., Liao, Y., Jiang, P., Wu, T., Zhang, H., Xu, P., Chen, X., Zhou, H., Liu, Y., Wang, W., & Wu, X. (2022). Disruption of LLM9428/OsCATC Represses Starch Metabolism and Confers Enhanced Blast Resistance in Rice. *International journal of molecular sciences*, 23(7), 3827. <https://doi.org/10.3390/ijms23073827>
- Liao, Y., Bai, Q., Xu, P., Wu, T., Guo, D., Peng, Y., Zhang, H., Deng, X., Chen, X., Luo, M., Ali, A., Wang, W., & Wu, X. (2018). Mutation in Rice Abscisic Acid2 Results in Cell Death, Enhanced Disease-Resistance, Altered Seed Dormancy and Development. *Frontiers in plant science*, 9, 405. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00405>

- Lim, S. & Kim, J. & Lee, J. & Hwang, S.-G. & Shim, S.-H. & Jeon, J.-S. & Jang, C.. (2021). Role of OsCZMT1 in Na<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup> transport and salinity insensitivity. *Environmental and Experimental Botany*. 194. 104754. [10.1016/j.envexpbot.2021.104754](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104754).
- Liu C.X., Yang T, Zhou H, Ahammed GJ, Qi ZY, Zhou J. The E3 Ubiquitin Ligase Gene Sl1 Is Critical for Cadmium Tolerance in *Solanum lycopersicum* L. *Antioxidants* (Basel). 2022 Feb 25;11(3):456. doi: [10.3390/antiox11030456](https://doi.org/10.3390/antiox11030456). PMID: 35326106; PMCID: PMC8944816.
- Liu D, Chen X, Liu J, Ye J, Guo Z. The rice ERF transcription factor OsERF922 negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance. *J Exp Bot*. 2012 Jun;63(10):3899-911. doi: [10.1093/jxb/ers079](https://doi.org/10.1093/jxb/ers079). Epub 2012 Mar 21. PMID: 22442415; PMCID: PMC3388842.
- Liu, B., Chen, S., Rose, A., Chen, D., Cao, F., Zwinderman, M., Kiemel, D., Aïssi, M., Dekker, F. J., & Haisma, H. J. (2020). Inhibition of histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 enhances CRISPR/Cas9 genome editing. *Nucleic acids research*, 48(2), 517–532. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1136>
- Liu, H., Wang, K., Tang, H., Gong, Q., Du, L., Pei, X., & Ye, X. (2020). CRISPR/Cas9 editing of wheat TaQ genes alters spike morphogenesis and grain threshability. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, 47(9), 563–575. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2020.08.004>
- Liu, L., Gallagher, J., Arevalo, E. D., Chen, R., Skopelitis, T., Wu, Q., Bartlett, M., & Jackson, D. (2021). Enhancing grain-yield-related traits by CRISPR-Cas9 promoter editing of maize CLE genes. *Nature plants*, 7(3), 287–294. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00858-5>
- Liu, L., Zhang, J., Xu, J., Li, Y., Guo, L., Wang, Z., Zhang, X., Zhao, B., Guo, Y. D., & Zhang, N. (2020). CRISPR/Cas9 targeted mutagenesis of SILBD40, a lateral organ boundaries domain transcription factor, enhances drought tolerance in tomato. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, 301, 110683. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110683>
- Liu, L., Zheng, C., Kuang, B., Wei, L., Yan, L., & Wang, T. (2016). Receptor-Like Kinase RUPO Interacts with Potassium Transporters to Regulate Pollen Tube Growth and Integrity in Rice. *PLoS genetics*, 12(7), e1006085. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006085>
- Liu, X. (A), Ding, Q., Wang, W. et al. Targeted Deletion of the First Intron of the Wxb Allele via CRISPR/Cas9 Significantly Increases Grain Amylose Content in Rice. *Rice* 15, 1 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12284-021-00548-y>
- Liu, X. (B), Yang, X., Xie, Q., Miao, H., Bo, K., Dong, S., Xin, T., Gu, X., Sun, J., & Zhang, S. (2022). NS encodes an auxin transporter that regulates the 'numerous spines' trait in cucumber (*Cucumis sativus*) fruit. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 110(2), 325–336. <https://doi.org/10.1111/tpj.15710>
- Liu, Y., Du, Z., Lin, S., Li, H., Lu, S., Guo, L., & Tang, S. (2022). CRISPR/Cas9-Targeted Mutagenesis of BnaFAE1 Genes Confers Low-Erucic Acid in *Brassica napus*. *Frontiers in plant science*, 13, 848723. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.848723>
- Liu, Y., Merrick, P., Zhang, Z., Ji, C., Yang, B., & Fei, S. Z. (2018). Targeted mutagenesis in tetraploid switchgrass (*Panicum virgatum* L.) using CRISPR/Cas9. *Plant biotechnology journal*, 16(2), 381–393. <https://doi.org/10.1111/pbi.12778>
- Lobell DB, Gourdji SM. The influence of climate change on global crop productivity. *Plant Physiol*. 2012 Dec;160(4):1686-97. doi: [10.1104/pp.112.208298](https://doi.org/10.1104/pp.112.208298). Epub 2012 Oct 10. PMID: 23054565; PMCID: PMC3510102.
- Lou, D., Wang, H., Liang, G., & Yu, D. (2017). OsSAPK2 Confers Abscisic Acid Sensitivity and Tolerance to Drought Stress in Rice. *Frontiers in plant science*, 8, 993. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00993>
- Lu K, Wu B, Wang J, Zhu W, Nie H, Qian J, Huang W, Fang Z. Blocking amino acid transporter OsAAP3 improves grain yield by promoting outgrowth buds and increasing tiller number in rice. *Plant Biotechnol J*. 2018 Oct;16(10):1710-1722. doi: [10.1111/pbi.12907](https://doi.org/10.1111/pbi.12907). Epub 2018 Mar 25. PMID: 29479779; PMCID: PMC6131477.
- Lu, H.P., Luo, T., Fu, Hw. et al. Resistance of rice to insect pests mediated by suppression of serotonin biosynthesis. *Nature Plants* 4, 338–344 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0152-7>
- Luo, S., Ma, Q., Zhong, Y., Jing, J., Wei, Z., Zhou, W., Lu, X., Tian, Y., & Zhang, P. (2022). Editing of the starch branching enzyme gene SBE2 generates high-amylose storage roots in cassava. *Plant molecular biology*, 108(4-5), 429–442. <https://doi.org/10.1007/s11103-021-01215-y>
- Lyu, X., Cheng, Q., Qin, C., Li, Y., Xu, X., Ji, R., Mu, R., Li, H., Zhao, T., Liu, J., Zhou, Y., Li, H., Yang, G., Chen, Q., & Liu, B. (2021). GmCRY1s modulate gibberellin metabolism to regulate soybean shade avoidance in response to reduced blue light. *Molecular plant*, 14(2), 298–314. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.11.016>
- Ma, J., Chen, J., Wang, M., Ren, Y., Wang, S., Lei, C., Cheng, Z., & Sodmergen (2018). Disruption of OsSEC3A increases the content of salicylic acid and induces plant defense responses in rice. *Journal of experimental botany*, 69(5), 1051–1064. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx458>

- Ma, J., Sun, S., Whelan, J., & Shou, H. (2021). CRISPR/Cas9-Mediated Knockout of GmFATB1 Significantly Reduced the Amount of Saturated Fatty Acids in Soybean Seeds. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 3877. <https://doi.org/10.3390/ijms22083877>
- Ma, L., Li, T., Hao, C., Wang, Y., Chen, X., & Zhang, X. (2016). TaGS5-3A, a grain size gene selected during wheat improvement for larger kernel and yield. *Plant biotechnology journal*, 14(5), 1269–1280. <https://doi.org/10.1111/pbi.12492>
- Macovei A, Sevilla NR, Cantos C, Jonson GB, Slamet-Loedin I, Čermák T, Voytas DF, Choi IR, Chadha-Mohanty P. Novel alleles of rice eIF4G generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to Rice tungro spherical virus. *Plant Biotechnol J*. 2018 Nov;16(11):1918-1927. doi: 10.1111/pbi.12927. Epub 2018 Apr 30. PMID: 29604159; PMCID: PMC6181218.
- Maher Micheal F. , Nasti Ryan A., Vollbrecht Macy, Starker Colby G. , Clark Matthew D., Voytas Daniel F. . 2020. "Plant gene editing through de novo induction of meristems". *Nature Biotechnology*. 2020. 38(1) : 84-89. doi 10.1038/s41587-019-0337-2.
- Maioli A, Gianoglio S, Moglia A, Acquadro A, Valentino D, Milani AM, Prohens J, Orzaez D, Granell A, Lanteri S, Comino C. Simultaneous CRISPR/Cas9 Editing of Three PPO Genes Reduces Fruit Flesh Browning in *Solanum melongena* L. *Front Plant Sci*. 2020 Dec 3;11:607161. doi: 10.3389/fpls.2020.607161. PMID: 33343607; PMCID: PMC7744776.
- Makhotenko, A.V., Khromov, A.V., Snigir, E.A. et al. Functional Analysis of Coilin in Virus Resistance and Stress Tolerance of Potato *Solanum tuberosum* using CRISPR-Cas9 Editing. *Dokl Biochem Biophys* 484, 88–91 (2019). <https://doi.org/10.1134/S1607672919010241>
- Malnoy, M., Viola, R., Jung, M. H., Koo, O. J., Kim, S., Kim, J. S., Velasco, R., & Nagamangala Kanchiswamy, C. (2016). DNA-Free Genetically Edited Grapevine and Apple Protoplast Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins. *Frontiers in plant science*, 7, 1904. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01904>
- Manuel Nieves-Cordones, Sonia Mohamed, Keitaro Tanoi, Natsuko I. Kobayashi, Keiko Takagi, Aurore Vernet, Emmanuel Guiderdoni, Christophe Périn, Hervé Sentenac, and Anne-Aliénor Véry. "Production of low-Cs+ rice plants by inactivation of the K+ transporter OsHAK1 with the CRISPR-Cas system" *plant journal* 92, no. 1 (2017): 43-56. doi: 10.1111/tpj.13632
- Mao C, He J, Liu L, Deng Q, Yao X, Liu C, Qiao Y, Li P, Ming F. OsNAC2 integrates auxin and cytokinin pathways to modulate rice root development. *Plant Biotechnol J*. 2020 Feb;18(2):429-442. doi: 10.1111/pbi.13209. Epub 2019 Aug 7. PMID: 31389120; PMCID: PMC6953191.
- Mao, X., Zheng, Y., Xiao, K., Wei, Y., Zhu, Y., Cai, Q., Chen, L., Xie, H., & Zhang, J. (2018). OsPRX2 contributes to stomatal closure and improves potassium deficiency tolerance in rice. *Biochemical and biophysical research communications*, 495(1), 461–467. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.045>
- Martin Avila, Elena, Martin F. Gisby, et Anil Day. 2016. « Seamless Editing of the Chloroplast Genome in Plants ». *BMC Plant Biology* 16 (1). doi:10.1186/s12870-016-0857-6.
- McCarty Nicholas S., Graham Alicia E., Studena Lucie, Ledesma-Amaro Rodrigo, 2020. "Multiplex CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation". *Nature communications*. 2020. 11 :1281. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15053-x>
- Miao C, Xiao L, Hua K, Zou C, Zhao Y, Bressan RA, Zhu JK. Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jun 5;115(23):6058-6063. doi: 10.1073/pnas.1804774115. Epub 2018 May 21. PMID: 29784797; PMCID: PMC6003368.
- Miao, C., Wang, D., He, R., Liu, S., & Zhu, J. K. (2020). Mutations in MIR396e and MIR396f increase grain size and modulate shoot architecture in rice. *Plant biotechnology journal*, 18(2), 491–501. <https://doi.org/10.1111/pbi.13214>
- Miguel, C., Marum, L., 2011. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany* 62, 3713–3725. <https://doi.org/10.1093/jxb/err155>
- Mishra, R., Mohanty, J.N., Mahanty, B. et al. A single transcript CRISPR/Cas9 mediated mutagenesis of CaERF28 confers anthracnose resistance in chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *Planta* 254, 5 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03660-x>
- Montecillo, J.A.V.; Chu, L.L.; Bae, H. CRISPR-Cas9 System for Plant Genome Editing: Current Approaches and Emerging Developments. *Agronomy* 2020, 10, 1033. <https://doi.org/10.3390/agronomy10071033>
- Morineau, Céline & Bellec, Yannick & Tellier, Frederique & Gissot, Lionel & Kelemen, Zsolt & Nogue, Fabien & Faure, Jean-Denis. (2016). Selective gene dosage by CRISPR-Cas9 genome editing in hexaploid *Camelina sativa*. *Plant Biotechnology Journal*. 15. 10.1111/pbi.12671.

- Mottram, D., Wedzicha, B. & Dodson, A. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 419, 448–449 (2002). <https://doi.org/10.1038/419448a>
- Mu, R., Lyu, X., Ji, R., Liu, J., Zhao, T., Li, H., & Liu, B. (2022). GmBICs Modulate Low Blue Light-Induced Stem Elongation in Soybean. *Frontiers in plant science*, 13, 803122. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.803122>
- Naim, F., Dugdale, B., Kleidon, J. et al. Gene editing the phytoene desaturase alleles of Cavendish banana using CRISPR/Cas9. *Transgenic Res* 27, 451–460 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0083-0>
- Nakayasu, M., Akiyama, R., Lee, H. J., Osakabe, K., Osakabe, Y., Watanabe, B., Sugimoto, Y., Umemoto, N., Saito, K., Muranaka, T., & Mizutani, M. (2018). Generation of  $\alpha$ -solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the St16DOX gene. *Plant physiology and biochemistry : PPB*, 131, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.026>
- Nam, H., Gupta, A., Nam, H., Lee, S., Cho, H. S., Park, C., Park, S., Park, S. J., & Hwang, I. (2022). JULGI-mediated increment in phloem transport capacity relates to fruit yield in tomato. *Plant biotechnology journal*, 10.1111/pbi.13831. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/pbi.13831>
- Nawaz G, Usman B, Peng H, Zhao N, Yuan R, Liu Y, Li R. Knockout of Pi21 by CRISPR/Cas9 and iTRAQ-Based Proteomic Analysis of Mutants Revealed New Insights into *M. oryzae* Resistance in Elite Rice Line. *Genes (Basel)*. 2020 Jul 2;11(7):735. doi: 10.3390/genes11070735. PMID: 32630695; PMCID: PMC7396999.
- Negin, Boaz & Hen-Avivi, Shelly & Almekias-Siegl, Efrat & Shachar, Lior & Aharoni, Asaph. (2021). Cuticular Wax Composition is Essential for Plant Recovery Following Drought with Little Effect under Optimal Conditions. 10.1101/2021.06.08.447487.
- Nekrasov V, Wang C, Win J, Lanz C, Weigel D, Kamoun S. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci Rep*. 2017 Mar 28;7(1):482. doi: 10.1038/s41598-017-00578-x. PMID: 28352080; PMCID: PMC5428673.
- Nieves-Cordones, M., Mohamed, S., Tanoi, K., Kobayashi, N. I., Takagi, K., Vernet, A., Guiderdoni, E., Périn, C., Sentenac, H., & Véry, A. A. (2017). Production of low-Cs<sup>+</sup> rice plants by inactivation of the K<sup>+</sup> transporter OsHAK1 with the CRISPR-Cas system. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 92(1), 43–56. <https://doi.org/10.1111/tpj.13632>
- Nishihara, M., Higuchi, A., Watanabe, A. et al. Application of the CRISPR/Cas9 system for modification of flower color in *Torenia fournieri*. *BMC Plant Biol* 18, 331 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1539-3>
- Nitarska, D., Boehm, R., Debener, T. et al. First genome edited poinsettias: targeted mutagenesis of flavonoid 3'-hydroxylase using CRISPR/Cas9 results in a colour shift. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 147, 49–60 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02103-5>
- Njuguna, Elizabeth & Coussens, Griet & Aesaert, Stijn & Neyt, Piet & Anami, Sylvester & Lijsebettens, Mieke. (2018). Modulation of energy homeostasis in maize and Arabidopsis to develop lines tolerant to drought, genotoxic and oxidative stresses. *Afrika Focus*. 30. 10.21825/af.v30i2.8080.
- Nogué, Fabien, Kostlend Mara, Cécile Collonnier, et Josep M. Casacuberta. 2016. « Genome Engineering and Plant Breeding: Impact on Trait Discovery and Development ». *Plant Cell Reports* 35 (7): 1475-86. doi:10.1007/s00299-016-1993-z.
- Nonaka S, Arai C, Takayama M, Matsukura C, Ezura H. Efficient increase of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis. *Sci Rep*. 2017 Aug 1;7(1):7057. doi: 10.1038/s41598-017-06400-y. Erratum in: *Sci Rep*. 2019 Dec 19;9(1):19822. PMID: 28765632; PMCID: PMC5539196.
- Noureen, A., Zuhair Khan, M., Amin, I., Zainab, T., Ahmad, N., Haider, S., & Mansoor, S. (2022). Broad-spectrum resistance against multiple PVY-strains by CRISPR/Cas13 system in *Solanum tuberosum* crop. *GM crops & food*, 13(1), 97–111. <https://doi.org/10.1080/21645698.2022.2080481>
- Ogata, T., Ishizaki, T., Fujita, M., & Fujita, Y. (2020). CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of OsERA1 confers enhanced responses to abscisic acid and drought stress and increased primary root growth under nonstressed conditions in rice. *PloS one*, 15(12), e0243376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243376>
- Okuzaki, A., Ogawa, T., Koizuka, C., Kaneko, K., Inaba, M., Imamura, J., & Koizuka, N. (2018). CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in *Brassica napus*. *Plant physiology and biochemistry : PPB*, 131, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.025>
- Oliva, R., Ji, C., Atienza-Grande, G. et al. Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing. *Nat Biotechnol* 37, 1344–1350 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0267-z>
- Ort, Donald R., Sabeeha S. Merchant, Jean Alric, Alice Barkan, Robert E. Blankenship, Ralph Bock, Roberta Croce, et al. 2015. « Redesigning Photosynthesis to Sustainably Meet Global Food and Bioenergy

- Demand ». Proceedings of the National Academy of Sciences 112 (28): 8529-36. doi:10.1073/pnas.1424031112.
- Ozseyhan, M. E., Kang, J., Mu, X., & Lu, C. (2018). Mutagenesis of the FAE1 genes significantly changes fatty acid composition in seeds of *Camelina sativa*. *Plant physiology and biochemistry : PPB*, 123, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.11.021>
- Pathi, K. M., Rink, P., Budhagatapalli, N., Betz, R., Saado, I., Hiekel, S., Becker, M., Djamei, A., & Kumlehn, J. (2020). Engineering Smut Resistance in Maize by Site-Directed Mutagenesis of LIPOXYGENASE 3. *Frontiers in plant science*, 11, 543895. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.543895>
- Pekin, D., Skhiri, Y., Baret, J.-C., Corre, D.L., Mazutis, L., Salem, C.B., Millot, F., HARRAK, A.E., Brian Hutchison, J., W. Larson, J., R. Link, D., Laurent-Puig, P., D. Griffiths, A., Taly, V., 2011. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab on a Chip* 11, 2156–2166. <https://doi.org/10.1039/C1LC20128J>
- Peng, C., Zheng, M., Ding, L., Chen, X., Wang, X., Feng, X., Wang, J., Xu, J., 2020. Accurate Detection and Evaluation of the Gene-Editing Frequency in Plants Using Droplet Digital PCR. *Frontiers in Plant Science* 11.
- Petolino, Joseph F., et Sandeep Kumar. 2016. « Transgenic Trait Deployment Using Designed Nucleases ». *Plant Biotechnology Journal* 14 (2): 503-9. doi:10.1111/pbi.12457
- Pramanik, D., Shelake, R. M., Park, J., Kim, M. J., Hwang, I., Park, Y., & Kim, J. Y. (2021). CRISPR/Cas9-Mediated Generation of Pathogen-Resistant Tomato against Tomato Yellow Leaf Curl Virus and Powdery Mildew. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 1878. <https://doi.org/10.3390/ijms22041878>
- Pröbsting, M., Schenke, D., Hossain, R., Häder, C., Thureau, T., Wighardt, L., Schuster, A., Zhou, Z., Ye, W., Rietz, S., Leckband, G., & Cai, D. (2020). Loss of function of CRT1a (calreticulin) reduces plant susceptibility to *Verticillium longisporum* in both *Arabidopsis thaliana* and oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant biotechnology journal*, 18(11), 2328–2344. <https://doi.org/10.1111/pbi.13394>
- Prud'homme Loïc et Procaccia Catherine, 2021. "Rapport au nom de l'office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques - Les nouvelles techniques de sélection végétale en 2021 : Avantages, Limites, Acceptabilité". Assemblée nationale. 3 juin 2021. N°4220
- Qian L, Jin H, Yang Q, Zhu L, Yu X, Fu X, Zhao M, Yuan F. A Sequence Variation in GmBADH2 Enhances Soybean Aroma and Is a Functional Marker for Improving Soybean Flavor. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 8;23(8):4116. doi: 10.3390/ijms23084116. PMID: 35456933; PMCID: PMC9030070.
- Qian, W., Wu, C., Fu, Y., Hu, G., He, Z., & Liu, W. (2017). Novel rice mutants overexpressing the brassinosteroid catabolic gene CYP734A4. *Plant molecular biology*, 93(1-2), 197–208. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0558-4>
- Quétier, Francis. 2016. « The CRISPR-Cas9 Technology: Closer to the Ultimate Toolkit for Targeted Genome Editing ». *Plant Science* 242 (janvier): 65-76. doi:10.1016/j.plantsci.2015.09.003.
- Raffan, S., Sparks, C., Huttly, A., Hyde, L., Martignago, D., Mead, A., Hanley, S. J., Wilkinson, P. A., Barker, G., Edwards, K. J., Curtis, T. Y., Usher, S., Kosik, O., & Halford, N. G. (2021). Wheat with greatly reduced accumulation of free asparagine in the grain, produced by CRISPR/Cas9 editing of asparagine synthetase gene TaASN2. *Plant biotechnology journal*, 19(8), 1602–1613. <https://doi.org/10.1111/pbi.13573>
- Rai, M.K., 2021. Somaclonal Variation in Improvement of Agricultural Crops: Recent Progress, in: Kumar Srivastava, D., Kumar Thakur, A., Kumar, P. (Eds.), *Agricultural Biotechnology: Latest Research and Trends*. Springer Nature, Singapore, pp. 129–146. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-2339-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-16-2339-4_6)
- Raitskin, Oleg, et Nicola J Patron. 2016. « Multi-gene engineering in plants with RNA-guided Cas9 nuclease ». *Current Opinion in Biotechnology, Food biotechnology • Plant biotechnology*, 37: 69-75. doi:10.1016/j.copbio.2015.11.008.
- Ramírez Gonzales, L., Shi, L., Bergonzi, S. B., Oortwijn, M., Franco-Zorrilla, J. M., Solano-Tavira, R., Visser, R., Abelenda, J. A., & Bachem, C. (2021). Potato CYCLING DOF FACTOR 1 and its lncRNA counterpart StFLORE link tuber development and drought response. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 105(4), 855–869. <https://doi.org/10.1111/tpj.15093>
- Ranghoo-Sanmukhiya, V.M., 2021. Somaclonal Variation and Methods Used for Its Detection, in: Siddique, I. (Ed.), *Propagation and Genetic Manipulation of Plants*. Springer, Singapore, pp. 1–18. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-7736-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-7736-9_1)
- Rani, Reema, Prashant Yadav, Kalyani M. Barbadikar, Nikita Baliyan, Era Vaidya Malhotra, Binay Kumar Singh, Arun Kumar, et Dhiraj Singh. 2016. « CRISPR/Cas9: A Promising Way to Exploit Genetic Variation in Plants ». *Biotechnology Letters*, août. doi:10.1007/s10529-016-2195-z.
- Rasheed, A., Gill, R. A., Hassan, M. U., Mahmood, A., Qari, S., Zaman, Q. U., Ilyas, M., Aamer, M., Batool, M., Li, H., & Wu, Z. (2021). A Critical Review: Recent Advancements in the Use of CRISPR/Cas9

- Technology to Enhance Crops and Alleviate Global Food Crises. *Current issues in molecular biology*, 43(3), 1950–1976. <https://doi.org/10.3390/cimb43030135>
- Règle 27 – Inventions biotechnologiques brevetables - La Convention sur le brevet européen, Règlement d'exécution – de la Convention sur la délivrance de brevets européens, Deuxième partie – Dispositions d'application de la deuxième partie de la convention, Chapitre V – Inventions biotechnologiques (epo.org)
- Ren, Y., Sun, H., Zong, M., Guo, S., Ren, Z., Zhao, J., Li, M., Zhang, J., Tian, S., Wang, J., Yu, Y., Gong, G., Zhang, H., He, H., Li, L., Zhang, X., Liu, F., Fei, Z., & Xu, Y. (2020). Localization shift of a sugar transporter contributes to phloem unloading in sweet watermelons. *The New phytologist*, 227(6), 1858–1871. <https://doi.org/10.1111/nph.16659>
- Rodríguez-Leal, D., Lemmon, Z. H., Man, J., Bartlett, M. E., & Lippman, Z. B. (2017). Engineering Quantitative Trait Variation for Crop Improvement by Genome Editing. *Cell*, 171(2), 470–480.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.030>
- Ruyi, Ren & Qiang, Zheng & Futai, Ni & Qiu, Jin & Xiuqing, Wan & Jicheng, Wei. (2021). Breeding for PVY resistance in tobacco LJ911 using CRISPR/Cas9 technology. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 21. 10.1590/1984-70332021v21n1a6.
- Ryota Akiyama, Masaru Nakayasu, Naoyuki Umemoto, Toshiya Muranaka, Masaharu Mizutani, *Molecular breeding of SGA-free potatoes accumulating pharmaceutically useful saponins, Regulation of Plant Growth & Development*, 2017, Volume 52, Issue 2, Pages 92-98, Released on J-STAGE January 12, 2018, Online ISSN 2189-6305, Print ISSN 1346-5406, [https://doi.org/10.18978/jscrp.52.2\\_92](https://doi.org/10.18978/jscrp.52.2_92), [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jscrp/52/2/52\\_92/\\_article/-char/en](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jscrp/52/2/52_92/_article/-char/en),
- Sadras, Victor & Denison, R. (2009). Do plants compete for resources? An evolutionary viewpoint. *The New phytologist*. 183. 565-74. 10.1111/j.1469-8137.2009.02848.x.
- Sánchez-León, S., Gil-Humanes, J., Ozuna, C. V., Giménez, M. J., Sousa, C., Voytas, D. F., & Barro, F. (2018). Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant biotechnology journal*, 16(4), 902–910. <https://doi.org/10.1111/pbi.12837>
- Santillán Martínez, M.I., Bracuto, V., Koseoglou, E. et al. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the tomato susceptibility gene PMR4 for resistance against powdery mildew. *BMC Plant Biol* 20, 284 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02497-y>
- Sashidhar, N., Harloff, H. J., Potgieter, L., & Jung, C. (2020). Gene editing of three BnITPK genes in tetraploid oilseed rape leads to significant reduction of phytic acid in seeds. *Plant biotechnology journal*, 18(11), 2241–2250. <https://doi.org/10.1111/pbi.13380>
- Saxena, Pallavi & Singh, Nitin & Harish, & Singh, Amit Kumar & Pandey, Siddhartha & Thanki, Arti & Yadav, Tara. (2020). Recent advances in phytoremediation using genome engineering CRISPR–Cas9 technology. 10.1016/B978-0-12-819025-8.00005-3.
- Schmidt, C., Fransz, P., Rönspies, M. et al. Changing local recombination patterns in Arabidopsis by CRISPR/Cas mediated chromosome engineering. *Nat Commun* 11, 4418 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18277-z>
- Shao X, Wu S, Dou T, Zhu H, Hu C, Huo H, He W, Deng G, Sheng O, Bi F, Gao H, Dong T, Li C, Yang Q, Yi G. Using CRISPR/Cas9 genome editing system to create MaGA20ox2 gene-modified semi-dwarf banana. *Plant Biotechnol J*. 2020 Jan;18(1):17-19. doi: 10.1111/pbi.13216. Epub 2019 Aug 20. PMID: 31344316; PMCID: PMC6920167.
- Shao, G.& Xie, L. & Jiao, G.& Wei, X.& Sheng, Z. & Tang, S. & Hu, P. (2017). CRISPR/CAS9-mediated editing of the fragrant gene *Badh2* in rice. *Chinese Journal of Rice Science*. 31. 216-222. 10.16819/j.1001-7216.2017.6098.
- Shen, L., Hua, Y., Fu, Y., Li, J., Liu, Q., Jiao, X., Xin, G., Wang, J., Wang, X., Yan, C., & Wang, K. (2017). Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice. *Science China. Life sciences*, 60(5), 506–515. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9008-8>
- Shen, L., Wang, C., Fu, Y., Wang, J., Liu, Q., Zhang, X., Yan, C., Qian, Q., & Wang, K. (2018). QTL editing confers opposing yield performance in different rice varieties. *Journal of integrative plant biology*, 60(2), 89–93. <https://doi.org/10.1111/jipb.12501>
- Sheng X, Sun Z, Wang X, Tan Y, Yu D, Yuan G, Yuan D, Duan M. Improvement of the Rice "Easy-to-Shatter" Trait via CRISPR/Cas9-Mediated Mutagenesis of the *qSH1* Gene. *Front Plant Sci*. 2020 May 25;11:619. doi: 10.3389/fpls.2020.00619. PMID: 32528496; PMCID: PMC7262966.
- Sheng, M., Ma, X., Wang, J., Xue, T., Li, Z., Cao, Y., Yu, X., Zhang, X., Wang, Y., Xu, W., & Su, Z. (2022). KNOX II transcription factor HOS59 functions in regulating rice grain size. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 110(3), 863–880. <https://doi.org/10.1111/tpj.15709>
- Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, Yang M, Hakimi SM, Mo H, Habben JE. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant*

- Biotechnol J. 2017 Feb;15(2):207-216. doi: 10.1111/pbi.12603. Epub 2016 Aug 17. PMID: 27442592; PMCID: PMC5258859.
- Shi, M. & Du, Z-Y. & Hua, Q. & Kai, G. (2021). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of bZIP2 in *Salvia miltiorrhiza* leads to promoted phenolic acid biosynthesis. *Industrial Crops and Products*. 167. 113560. 10.1016/j.indcrop.2021.113560.
- Snow, A.A., Andow, D.A., Gepts, P., Hallerman, E.M., Power, A., Tiedje, J.M., Wolfenbarger, L.L., 2005. Genetically engineered organisms and the environment: Current status and recommendations. *Ecol. Appl.* 15, 377–404. <https://doi.org/10.1890/04-0539>
- Song, X., Meng, X., Guo, H. et al. Targeting a gene regulatory element enhances rice grain yield by decoupling panicle number and size. *Nat Biotechnol* (2022). <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01281-7>
- Songmei, Liu & Jie, Jiang & Yang, Liu & Jun, Meng & Shouling, Xu & Yuanyuan, Tan & Youfa, Li & Qingyao, Shu & Jianzhong, Huang. (2019). Characterization and Evaluation of OsLCT1 and OsNramp5 Mutants Generated Through CRISPR/Cas9-Mediated Mutagenesis for Breeding Low Cd Rice. *Rice Science*. 26. 88-97. 10.1016/j.rsci.2019.01.002.
- Sovová, Tereza, Gerard Kerins, Kateřina Demnerová, et Jaroslava Ovesná. 2016. « Genome Editing with Engineered Nucleases in Economically Important Animals and Plants: State of the Art in the Research Pipeline ». *Current Issues in Molecular Biology* 21 (juin): 41-62.
- Soyk, S., Müller, N. A., Park, S. J., Schmalenbach, I., Jiang, K., Hayama, R., Zhang, L., Van Eck, J., Jiménez-Gómez, J. M., & Lippman, Z. B. (2017). Variation in the flowering gene SELF PRUNING 5G promotes day-neutrality and early yield in tomato. *Nature genetics*, 49(1), 162–168. <https://doi.org/10.1038/ng.3733>
- Stanic M, Hickerson NMN, Arunraj R, Samuel MA. Gene-editing of the strigolactone receptor BnD14 confers promising shoot architectural changes in *Brassica napus* (canola). *Plant Biotechnol J*. 2021 Apr;19(4):639-641. doi: 10.1111/pbi.13513. Epub 2021 Jan 13. PMID: 33219600; PMCID: PMC8051593.
- Sun, M., Li, H., Li, Y., Xiang, H., Liu, Y., He, Y., Qi, M., & Li, T. (2020). Tomato YABBY2b controls plant height through regulating indole-3-acetic acid-amido synthetase (GH3.8) expression. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, 297, 110530. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110530>
- Sun, Q., Lin, L., Liu, D., Wu, D., Fang, Y., Wu, J., & Wang, Y. (2018). CRISPR/Cas9-Mediated Multiplex Genome Editing of the BnWRKY11 and BnWRKY70 Genes in *Brassica napus* L. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2716. <https://doi.org/10.3390/ijms19092716>
- Sun, Y., Jiao, G., Liu, Z., Zhang, X., Li, J., Guo, X., Du, W., Du, J., Francis, F., Zhao, Y., & Xia, L. (2017). Generation of High-Amylose Rice through CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis of Starch Branching Enzymes. *Frontiers in plant science*, 8, 298. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00298>
- Sun, Z., Zang, Y., Zhou, L., Song, Y., Chen, D., Zhang, Q., Liu, C., Yi, Y., Zhu, B., Fu, D., Zhu, H., & Qu, G. (2021). A tomato receptor-like cytoplasmic kinase, SIZRK1, acts as a negative regulator in wound-induced jasmonic acid accumulation and insect resistance. *Journal of experimental botany*, 72(20), 7285–7300. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab350>
- Svitashev, S., Schwartz, C., Lenderts, B., Young, J. K., & Mark Cigan, A. (2016). Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature communications*, 7, 13274. <https://doi.org/10.1038/ncomms13274>
- Swinnen, G., Mauxion, J. P., Baekelandt, A., De Clercq, R., Van Doorselaere, J., Inzé, D., Gonzalez, N., Goossens, A., & Pauwels, L. (2022). SIKIX8 and SIKIX9 are negative regulators of leaf and fruit growth in tomato. *Plant physiology*, 188(1), 382–396. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab464>
- Swinnen, Gwen, Alain Goossens, et Laurens Pauwels. 2016. « Lessons from Domestication: Targeting Cis-Regulatory Elements for Crop Improvement ». *Trends in Plant Science* 21 (6): 506-15. doi:10.1016/j.tplants.2016.01.014.
- Syombua ED, Zhang Z, Tripathi JN, Ntui VO, Kang M, George OO, Edward NK, Wang K, Yang B, Tripathi L. A CRISPR/Cas9-based genome-editing system for yam (*Dioscorea* spp.). *Plant Biotechnol J*. 2021 Apr;19(4):645-647. doi: 10.1111/pbi.13515. Epub 2020 Dec 13. PMID: 33222361; PMCID: PMC8051594. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14832-9>
- Tang, L. & Mao, Bigang & Li, Yaokui & Iv, Qiming & Zhang, LiPing & Chen, Caiyan & He, Hanjie & Wang, Weiping & Zeng, Xiongfeng & Shao, Ye & Pan, Yinlin & Hu, Yuanyi & Peng, Yan & Fu, Xiqin & Li, Hongqing & Xia, Shitou & Zhao, Bingran. (2017). Knockout of OsNramp5 using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating indica rice without compromising yield. *Scientific Reports*. 7. 10.1038/s41598-017-14832-9.
- Tang L., 2020. "PAM-LESS is more". *Natures Methods*. June 2020. 17, 559-565.

- Tang, Y., Huang, J., Ji, H., Pan, L., Hu, C., Qiu, X., Zhu, H., Sui, J., Wang, J., & Qiao, L. (2022). Identification of AhFatB genes through genome-wide analysis and knockout of AhFatB reduces the content of saturated fatty acids in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 319, 111247. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111247>
- Tang Y, Abdelrahman M, Li J, Wang F, Ji Z, Qi H, Wang C, Zhao K. CRISPR/Cas9 induces exon skipping that facilitates development of fragrant rice. *Plant Biotechnol J*. 2021 Apr;19(4):642-644. doi: 10.1111/pbi.13514. Epub 2020 Dec 8. PMID: 33217139; PMCID: PMC8051596.
- Tashkandi, Manal & Ali, Zahir & Aljedaani, Fatimah & Shami, Ashwag & Mahfouz, Magdy. (2017). Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato. 10.1101/237735.
- Teng, Kaichong & Wang, Xin & Guo, Xinying & Liu, Yaoguang & Li, Rongbai. (2021). Generation of a New Glutinous Photothermosensitive Genic-Male-Sterile (PTGMS) Line by CRISPR/Cas9-Directed Mutagenesis of Wx in Rice (*Oryza sativa* L.). *Agriculture*. 11. 1044. 10.3390/agriculture11111044.
- Tian, S., Jiang, L., Gao, Q. et al. Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon. *Plant Cell Rep* 36, 399–406 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2089-5>
- Toda, E., Koiso, N., Takebayashi, A., Ichikawa, M., Kiba, T., Osakabe, K., Osakabe, Y., Sakakibara, H., Kato, N., & Okamoto, T. (2019). An efficient DNA- and selectable-marker-free genome-editing system using zygotes in rice. *Nature plants*, 5(4), 363–368. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0386-z>
- Toinga-Villafuerte S, Vales MI, Awika JM, Rathore KS. CRISPR/Cas9-Mediated Mutagenesis of the Granule-Bound Starch Synthase Gene in the Potato Variety Yukon Gold to Obtain Amylose-Free Starch in Tubers. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 22;23(9):4640. doi: 10.3390/ijms23094640. PMID: 35563030; PMCID: PMC9101600.
- Tomlinson, L., Yang, Y., Emenecker, R., Smoker, M., Taylor, J., Perkins, S., Smith, J., MacLean, D., Olszewski, N. E., & Jones, J. (2019). Using CRISPR/Cas9 genome editing in tomato to create a gibberellin-responsive dominant dwarf DELLA allele. *Plant biotechnology journal*, 17(1), 132–140. <https://doi.org/10.1111/pbi.12952>
- Tran, M.T., Doan, D.T.H., Kim, J. et al. CRISPR/Cas9-based precise excision of SIHyPRP1 domain(s) to obtain salt stress-tolerant tomato. *Plant Cell Rep* 40, 999–1011 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02622-z>
- Tripathi, J.N., Ntui, V.O., Ron, M. et al. CRISPR/Cas9 editing of endogenous banana streak virus in the B genome of *Musa* spp. overcomes a major challenge in banana breeding. *Commun Biol* 2, 46 (2019). <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0288-7>
- Tu, Mingxing & Fang, Jinghao & Zhao, Ruikang & Liu, Xingyu & Wuchen, Yin & Wang, Ya & Wang, Xianhang & Wang, Xiping & Fang, Yulin. (2022). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of VvbZIP36 promotes anthocyanin accumulation in grapevine (*Vitis vinifera*). *Horticulture Research*. 10.1093/hr/uhac022.
- Tuncel, A., Corbin, K. R., Ahn-Jarvis, J., Harris, S., Hawkins, E., Smedley, M. A., Harwood, W., Warren, F. J., Patron, N. J., & Smith, A. M. (2019). Cas9-mediated mutagenesis of potato starch-branching enzymes generates a range of tuber starch phenotypes. *Plant biotechnology journal*, 17(12), 2259–2271. <https://doi.org/10.1111/pbi.13137>
- Ueta, R., Abe, C., Watanabe, T. et al. Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. *Sci Rep* 7, 507 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00501-4>
- Usman, B., Nawaz, G., Zhao, N., Liao, S., Qin, B., Liu, F., Liu, Y., & Li, R. (2020). Programmed Editing of Rice (*Oryza sativa* L.) OsSPL16 Gene Using CRISPR/Cas9 Improves Grain Yield by Modulating the Expression of Pyruvate Enzymes and Cell Cycle Proteins. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 249. <https://doi.org/10.3390/ijms22010249>
- Usman, B., Nawaz, G., Zhao, N., Liu, Y., & Li, R. (2020). Generation of High Yielding and Fragrant Rice (*Oryza sativa* L.) Lines by CRISPR/Cas9 Targeted Mutagenesis of Three Homoeologs of Cytochrome P450 Gene Family and OsBADH2 and Transcriptome and Proteome Profiling of Revealed Changes Triggered by Mutations. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(6), 788. <https://doi.org/10.3390/plants9060788>
- Varkonyi-Gasic, E., Wang, T., Voogd, C., Jeon, S., Drummond, R., Gleave, A. P., & Allan, A. C. (2019). Mutagenesis of kiwifruit CENTRORADIALIS-like genes transforms a climbing woody perennial with long juvenility and axillary flowering into a compact plant with rapid terminal flowering. *Plant biotechnology journal*, 17(5), 869–880. <https://doi.org/10.1111/pbi.13021>
- Vlčko, T., & Ohnoutková, L. (2020). Allelic Variants of CRISPR/Cas9 Induced Mutation in an Inositol Trisphosphate 5/6 Kinase Gene Manifest Different Phenotypes in Barley. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(2), 195. <https://doi.org/10.3390/plants9020195>



- Walton R.T., christie K.A., Whittaker Madelynn, Kleinstiver B.P., 2020. "Unconstrained Genome targeting With near-PAMless Engineered CRISPR-Cas9 Variant". *Science*. 2020 April 17; 368(6488): 290-296. [10.1126/science.aba8853](https://doi.org/10.1126/science.aba8853).
- Waltz E. (2016). Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature*, 532(7599), 293. <https://doi.org/10.1038/nature.2016.19754>
- Wan, D.Y., Guo, Y., Cheng, Y. et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of VvMLO3 results in enhanced resistance to powdery mildew in grapevine (*Vitis vinifera*). *Hortic Res* 7, 116 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0339-8>
- Wang B, Li N, Huang S, Hu J, Wang Q, Tang Y, Yang T, Asmutola P, Wang J, Yu Q. Enhanced soluble sugar content in tomato fruit using CRISPR/Cas9-mediated SIIINVINH1 and SIVPE5 gene editing. *PeerJ*. 2021 Nov 9;9:e12478. doi: 10.7717/peerj.12478. PMID: 34820200; PMCID: PMC8588851.
- Wang, C., Wang, G., Gao, Y., Lu, G., Habben, J. E., Mao, G., Chen, G., Wang, J., Yang, F., Zhao, X., Zhang, J., Mo, H., Qu, P., Liu, J., & Greene, T. W. (2020). A cytokinin-activation enzyme-like gene improves grain yield under various field conditions in rice. *Plant molecular biology*, 102(4-5), 373–388. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00952-5>
- Wang F, Wang C, Liu P, Lei C, Hao W, Gao Y, Liu YG, Zhao K. Enhanced Rice Blast Resistance by CRISPR/Cas9-Targeted Mutagenesis of the ERF Transcription Factor Gene OsERF922. *PLoS One*. 2016 Apr 26;11(4):e0154027. doi: 10.1371/journal.pone.0154027. PMID: 27116122; PMCID: PMC4846023.
- Wang FZ, Chen MX, Yu LJ, Xie LJ, Yuan LB, Qi H, Xiao M, Guo W, Chen Z, Yi K, Zhang J, Qiu R, Shu W, Xiao S, Chen QF. OsARM1, an R2R3 MYB Transcription Factor, Is Involved in Regulation of the Response to Arsenic Stress in Rice. *Front Plant Sci*. 2017 Oct 30;8:1868. doi: 10.3389/fpls.2017.01868. PMID: 29163593; PMCID: PMC5670359.
- Wang G, Zhang X, Huang W, Xu P, Lv Z, Zhao L, Wen J, Yi B, Ma C, Tu J, Fu T, Shen J. Increased seed number per silique in Brassica juncea by deleting cis-regulatory region affecting BjCLV1 expression in carpel margin meristem. *Plant Biotechnol J*. 2021 Nov;19(11):2333-2348. doi: 10.1111/pbi.13664. Epub 2021 Aug 31. PMID: 34260131; PMCID: PMC8541781.
- Wang, G., Wang, C., Lu, G., Wang, W., Mao, G., Habben, J. E., Song, C., Wang, J., Chen, J., Gao, Y., Liu, J., & Greene, T. W. (2020). Knockouts of a late flowering gene via CRISPR-Cas9 confer early maturity in rice at multiple field locations. *Plant molecular biology*, 104(1-2), 137–150. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-01031-w>
- Wang H, Wu Y, Zhang Y, Yang J, Fan W, Zhang H, Zhao S, Yuan L, Zhang P. CRISPR/Cas9-Based Mutagenesis of Starch Biosynthetic Genes in Sweet Potato (*Ipomoea Batatas*) for the Improvement of Starch Quality. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 23;20(19):4702. doi: 10.3390/ijms20194702. PMID: 31547486; PMCID: PMC6801948.
- Wang, J. & Kuang, H. & Zhang, Z. & Yang, Y. & Yan, L. & Zhang, M. & Song, S. & Guan, Y.. (2019). Generation of seed lipoxigenase-free soybean using CRISPR-Cas9. *The Crop Journal*. 8. 10.1016/j.cj.2019.08.008.
- Wang, P., Zhang, J., Sun, L., Ma, Y., Xu, J., Liang, S., Deng, J., Tan, J., Zhang, Q., Tu, L., Daniell, H., Jin, S., & Zhang, X. (2018). High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system. *Plant biotechnology journal*, 16(1), 137–150. <https://doi.org/10.1111/pbi.12755>
- Wang, S.(A), Zong, Y., Lin, Q. et al. Precise, predictable multi-nucleotide deletions in rice and wheat using APOBEC–Cas9. *Nat Biotechnol* 38, 1460–1465 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0566-4>
- Wang, S.(B) & Yang, Y. & Guo, M. & Zhong, C. & Yan, C-J. & Sun, S. (2020). Targeted mutagenesis of amino acid transporter genes for rice quality improvement using the CRISPR/Cas9 system. *The Crop Journal*. 8. 10.1016/j.cj.2020.02.005.
- Wang, T., Xun, H., Wang, W., Ding, X., Tian, H., Hussain, S., Dong, Q., Li, Y., Cheng, Y., Wang, C., Lin, R., Li, G., Qian, X., Pang, J., Feng, X., Dong, Y., Liu, B., & Wang, S. (2021). Mutation of GmAIR Genes by CRISPR/Cas9 Genome Editing Results in Enhanced Salinity Stress Tolerance in Soybean. *Frontiers in plant science*, 12, 779598. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.779598>
- Wang, W., Pan, Q., He, F., Akhunova, A., Chao, S., Trick, H., & Akhunov, E. (2018). Transgenerational CRISPR-Cas9 Activity Facilitates Multiplex Gene Editing in Allopolyploid Wheat. *The CRISPR journal*, 1(1), 65–74. <https://doi.org/10.1089/crispr.2017.0010>
- Wang, W., Ma, S., Hu, P., Ji, Y., & Sun, F. (2021). Genome Editing of Rice eIF4G Loci Confers Partial Resistance to Rice Black-Streaked Dwarf Virus. *Viruses*, 13(10), 2100. <https://doi.org/10.3390/v13102100>
- Wang, W. & Wang, W. & Pan, Y. & Tan, C. & Li, H. & Chen, Y. & Liu, X. & Wei, J. & Xu, N. & Han, Y. & Gu, H. & Ye, R. & Ding, Q. & Ma, C. (2022). A new gain-of-function OsGS2/GRF4 allele generated with

- CRISPR/Cas9 genome editing technology increases rice grain size and yield. *The Crop Journal*. 10.1016/j.cj.2022.01.004.
- Wang, X., Tu, M., Wang, D., Liu, J., Li, Y., Li, Z., Wang, Y., & Wang, X. (2018). CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in grape in the first generation. *Plant biotechnology journal*, 16(4), 844–855. <https://doi.org/10.1111/pbi.12832>
- Wang, Y.(A), Geng, L., Yuan, M., Wei, J., Jin, C., Li, M., Yu, K., Zhang, Y., Jin, H., Wang, E., Chai, Z., Fu, X., & Li, X. (2017). Deletion of a target gene in Indica rice via CRISPR/Cas9. *Plant cell reports*, 36(8), 1333–1343. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2158-4>
- Wang, Y.(B), Meng, Z., Liang, C., Meng, Z., Wang, Y., Sun, G., Zhu, T., Cai, Y., Guo, S., Zhang, R., & Lin, Y. (2017). Increased lateral root formation by CRISPR/Cas9-mediated editing of arginase genes in cotton. *Science China. Life sciences*, 60(5), 524–527. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9031-y>
- Wang, Y., Liu, X., Zheng, X., Wang, W., Yin, X., Liu, H., ... & Wang, F. (2021). Creation of aromatic maize by CRISPR/Cas. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(9), 1664-1670.
- Wang, Z., Wang, S., Li, D., Zhang, Q., Li, L., Zhong, C., Liu, Y., & Huang, H. (2018). Optimized paired-sgRNA/Cas9 cloning and expression cassette triggers high-efficiency multiplex genome editing in kiwifruit. *Plant biotechnology journal*, 16(8), 1424–1433. <https://doi.org/10.1111/pbi.12884>
- Watanabe, K., Oda-Yamamizo, C., Sage-Ono, K. et al. Alteration of flower colour in Ipomoea nil through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of carotenoid cleavage dioxygenase 4. *Transgenic Res* 27, 25–38 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11248-017-0051-0>
- Wilson, F.M., Harrison, K., Armitage, A.D. et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of phytoene desaturase in diploid and octoploid strawberry. *Plant Methods* 15, 45 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0428-6>
- Wu, Q., Liu, Y., & Huang, J. (2022). CRISPR-Cas9 Mediated Mutation in OsPUB43 Improves Grain Length and Weight in Rice by Promoting Cell Proliferation in Spikelet Hull. *International journal of molecular sciences*, 23(4), 2347. <https://doi.org/10.3390/ijms23042347>
- Xie, K. Minkenberg B., et Yang Y. 2015. « Boosting CRISPR/Cas9 Multiplex Editing Capability with the Endogenous tRNA-Processing System ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (11): 3570-75. doi:10.1073/pnas.1420294112.
- Xie, T., Chen, X., Guo, T., Rong, H., Chen, Z., Sun, Q., Batley, J., Jiang, J., & Wang, Y. (2020). Targeted Knockout of BnTT2 Homologues for Yellow-Seeded Brassica napus with Reduced Flavonoids and Improved Fatty Acid Composition. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(20), 5676–5690. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01126>
- Xie, Y., Niu, B., Long, Y., Li, G., Tang, J., Zhang, Y., Ren, D., Liu, Y. G., & Chen, L. (2017). Suppression or knockout of SaF/SaM overcomes the Sa-mediated hybrid male sterility in rice. *Journal of integrative plant biology*, 59(9), 669–679. <https://doi.org/10.1111/jipb.12564>
- Xing S, Chen K, Zhu H, Zhang R, Zhang H, Li B, Gao C. Fine-tuning sugar content in strawberry. *Genome Biol*. 2020 Sep 3;21(1):230. doi: 10.1186/s13059-020-02146-5. PMID: 32883370; PMCID: PMC7470447.
- Xing, M., Li, H., Liu, G., Zhu, B., Zhu, H., Grierson, D., Luo, Y., & Fu, D. (2022). A MADS-box transcription factor, SIMADS1, interacts with SIMACROCALYX to regulate tomato sepal growth. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, 322, 111366. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111366>
- Xu, R., Yang, Y., Qin, R., Li, H., Qiu, C., Li, L., Wei, P., & Yang, J. (2016). Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, 43(8), 529–532. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.07.003>
- Xu, ZS., Feng, K. & Xiong, AS. CRISPR/Cas9-Mediated Multiply Targeted Mutagenesis in Orange and Purple Carrot Plants. *Mol Biotechnol* 61, 191–199 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12033-018-00150-6>
- Yang, C-H. & Zhang, Y. & Huang, C-F.. (2018). Reduction in cadmium accumulation in japonica rice grains by CRISPR/Cas9-mediated editing of OsNRAMP5. *Journal of Integrative Agriculture*. 18. 10.1016/S2095-3119(18)61904-5.
- Yang, Q.(A), Wan, X., Wang, J., Zhang, Y., Zhang, J., Wang, T., Yang, C., & Ye, Z. (2020). The loss of function of HEL, which encodes a cellulose synthase interactive protein, causes helical and vine-like growth of tomato. *Horticulture research*, 7(1), 180. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00402-0>
- Yang, Q.(B), Zhong, X., Li, Q., Lan, J., Tang, H., Qi, P., Ma, J., Wang, J., Chen, G., Pu, Z., Li, W., Lan, X., Deng, M., Harwood, W., Li, Z., Wei, Y., Zheng, Y., & Jiang, Q. (2020). Mutation of the d-hordein gene by RNA-guided Cas9 targeted editing reducing the grain size and changing grain compositions in barley. *Food chemistry*, 311, 125892. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125892>

- Yang, T., Deng, L., Zhao, W., Zhang, R., Jiang, H., Ye, Z., Li, C. B., & Li, C. (2019). Rapid breeding of pink-fruited tomato hybrids using the CRISPR/Cas9 system. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, 46(10), 505–508. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2019.10.002>
- Yang, X., Chen, L., He, J. et al. Knocking out of carotenoid catabolic genes in rice fails to boost carotenoid accumulation, but reveals a mutation in strigolactone biosynthesis. *Plant Cell Rep* 36, 1533–1545 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2172-6>
- Yang, Y., Zhu, K., Li, H., Han, S., Meng, Q., Khan, S. U., Fan, C., Xie, K., & Zhou, Y. (2018). Precise editing of CLAVATA genes in Brassica napus L. regulates multilocular silique development. *Plant biotechnology journal*, 16(7), 1322–1335. <https://doi.org/10.1111/pbi.12872>
- Ye Y, Li P, Xu T, Zeng L, Cheng D, Yang M, Luo J, Lian X. OsPT4 Contributes to Arsenate Uptake and Transport in Rice. *Front Plant Sci.* 2017 Dec 22;8:2197. doi: 10.3389/fpls.2017.02197. PMID: 29312424; PMCID: PMC5744437.
- Yin, X., Biswal, A. K., Dionora, J., Perdigon, K. M., Balahadia, C. P., Mazumdar, S., Chater, C., Lin, H. C., Coe, R. A., Kretzschmar, T., Gray, J. E., Quick, P. W., & Bandyopadhyay, A. (2017). CRISPR-Cas9 and CRISPR-Cpf1 mediated targeting of a stomatal developmental gene EPFL9 in rice. *Plant cell reports*, 36(5), 745–757. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2118-z>
- Yoon, Y. J., Venkatesh, J., Lee, J. H., Kim, J., Lee, H. E., Kim, D. S., & Kang, B. C. (2020). Genome Editing of eIF4E1 in Tomato Confers Resistance to Pepper Mottle Virus. *Frontiers in plant science*, 11, 1098. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01098>
- Yu, J., Tu, L., Subburaj, S. et al. Simultaneous targeting of duplicated genes in Petunia protoplasts for flower color modification via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Plant Cell Rep* 40, 1037–1045 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02593-1>
- Yu W, Wang L, Zhao R, Sheng J, Zhang S, Li R, Shen L. Knockout of SIMAPK3 enhances tolerance to heat stress involving ROS homeostasis in tomato plants. *BMC Plant Biol.* 2019 Aug 14;19(1):354. doi: 10.1186/s12870-019-1939-z. PMID: 31412779; PMCID: PMC6694692.
- Yu, Y., Pan, Z., Wang, X., Bian, X., Wang, W., Liang, Q., Kou, M., Ji, H., Li, Y., Ma, D., Li, Z., & Sun, J. (2022). Targeting of SPCSV-RNase3 via CRISPR-Cas13 confers resistance against sweet potato virus disease. *Molecular plant pathology*, 23(1), 104–117. <https://doi.org/10.1111/mpp.13146>
- Yuan M, Zhu J, Gong L, He L, Lee C, Han S, Chen C, He G. Mutagenesis of FAD2 genes in peanut with CRISPR/Cas9 based gene editing. *BMC Biotechnol.* 2019 Apr 29;19(1):24. doi: 10.1186/s12896-019-0516-8. PMID: 31035982; PMCID: PMC6489235.
- Yuan, J., Chen, S., Jiao, W., Wang, L., Wang, L., Ye, W., Lu, J., Hong, D., You, S., Cheng, Z., Yang, D. L., & Chen, Z. J. (2017). Both maternally and paternally imprinted genes regulate seed development in rice. *The New phytologist*, 216(2), 373–387. <https://doi.org/10.1111/nph.14510>
- Yue Jin-Jun, Yang Jin-Ling, Wu Fu-Hui, Yuan Yu-Hsuan, Cheng Qiao-Wei, Hsu Chen-Tran and Lin Choun-Sae. 2021. " Protoplasts : From Isolation to CRISPR/Cas Genome Editing Application". 2021. *Frontiers in genome editing*. 2021. (3) art. 717017. doi: 10.3389/fgeed.2021.717017
- Yue, E., Cao, H., & Liu, B. (2020). OsmiR535, a Potential Genetic Editing Target for Drought and Salinity Stress Tolerance in *Oryza sativa*. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(10), 1337. <https://doi.org/10.3390/plants9101337>
- Yuste-Lisbona, F. J., Fernández-Lozano, A., Pineda, B., Bretones, S., Ortíz-Atienza, A., García-Sogo, B., Müller, N. A., Angosto, T., Capel, J., Moreno, V., Jiménez-Gómez, J. M., & Lozano, R. (2020). ENO regulates tomato fruit size through the floral meristem development network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(14), 8187–8195. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913688117>
- Zafar, K., Khan, M. Z., Amin, I., Mukhtar, Z., Yasmin, S., Arif, M., Ejaz, K., & Mansoor, S. (2020). Precise CRISPR-Cas9 Mediated Genome Editing in Super Basmati Rice for Resistance Against Bacterial Blight by Targeting the Major Susceptibility Gene. *Frontiers in plant science*, 11, 575. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00575>
- Zeng D, Liu T, Ma X, Wang B, Zheng Z, Zhang Y, Xie X, Yang B, Zhao Z, Zhu Q, Liu YG. Quantitative regulation of Waxy expression by CRISPR/Cas9-based promoter and 5'UTR-intron editing improves grain quality in rice. *Plant Biotechnol J.* 2020 Dec;18(12):2385-2387. doi: 10.1111/pbi.13427. Epub 2020 Jun 18. PMID: 32485068; PMCID: PMC7680535.
- Zeng, Y., Wen, J., Zhao, W., Wang, Q., & Huang, W. (2020). Rational Improvement of Rice Yield and Cold Tolerance by Editing the Three Genes OsPIN5b, GS3, and OsMYB30 With the CRISPR-Cas9 System. *Frontiers in plant science*, 10, 1663. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01663>
- Zhan X, Zhang F, Zhong Z, Chen R, Wang Y, Chang L, Bock R, Nie B, Zhang J. Generation of virus-resistant potato plants by RNA genome targeting. *Plant Biotechnol J.* 2019 Sep;17(9):1814-1822. doi: 10.1111/pbi.13102. Epub 2019 Mar 8. PMID: 30803101; PMCID: PMC6686122.

- Zhang, A., Liu, Y., Wang, F., Li, T., Chen, Z., Kong, D., Bi, J., Zhang, F., Luo, X., Wang, J., Tang, J., Yu, X., Liu, G., & Luo, L. (2019). Enhanced rice salinity tolerance via CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the OsRR22 gene. *Molecular breeding : new strategies in plant improvement*, 39, 47. <https://doi.org/10.1007/s11032-019-0954-y>
- Zhang, D., Tang, S., Xie, P., Yang, D., Wu, Y., Cheng, S., Du, K., Xin, P., Chu, J., Yu, F., & Xie, Q. (2022). Creation of fragrant sorghum by CRISPR/Cas9. *Journal of integrative plant biology*, 64(5), 961–964. <https://doi.org/10.1111/jipb.13232>
- Zhang, H., Si, X., Ji, X., Fan, R., Liu, J., Chen, K., Wang, D., & Gao, C. (2018). Genome editing of upstream open reading frames enables translational control in plants. *Nature biotechnology*, 36(9), 894–898. <https://doi.org/10.1038/nbt.4202>
- Zhang, J., Zhang, H., Botella, J. R., & Zhu, J. K. (2018). Generation of new glutinous rice by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the Waxy gene in elite rice varieties. *Journal of integrative plant biology*, 60(5), 369–375. <https://doi.org/10.1111/jipb.12620>
- Zhang, J., Zhang, H., Li, S., Li, J., Yan, L., & Xia, L. (2021). Increasing yield potential through manipulating of an ARE1 ortholog related to nitrogen use efficiency in wheat by CRISPR/Cas9. *Journal of integrative plant biology*, 63(9), 1649–1663. <https://doi.org/10.1111/jipb.13151>
- Zhang, J., Zhang, X., Chen, R., Yang, L., Fan, K., Liu, Y., Wang, G., Ren, Z., & Liu, Y. (2020). Generation of Transgene-Free Semidwarf Maize Plants by Gene Editing of Gibberellin-Oxidase20-3 Using CRISPR/Cas9. *Frontiers in plant science*, 11, 1048. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01048>
- Zhang, K., Zhuo, C., Wang, Z., Liu, F., Wen, J., Yi, B., Shen, J., Ma, C., Fu, T., & Tu, J. (2022). BnaA03.MKK5-BnaA06.MPK3/BnaC03.MPK3 Module Positively Contributes to Sclerotinia sclerotiorum Resistance in Brassica napus. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(5), 609. <https://doi.org/10.3390/plants11050609>
- Zhang, M., Liu, Q., Yang, X. et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of Clpsk1 in watermelon to confer resistance to Fusarium oxysporum f.sp. niveum. *Plant Cell Rep* 39, 589–595 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02516-0>
- Zhang, P., Du, H., Wang, J., Pu, Y., Yang, C., Yan, R., Yang, H., Cheng, H., & Yu, D. (2020). Multiplex CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering increases soya bean isoflavone content and resistance to soya bean mosaic virus. *Plant biotechnology journal*, 18(6), 1384–1395. <https://doi.org/10.1111/pbi.13302>
- Zhang, S., Shen, J., Li, D., & Cheng, Y. (2021). Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. *Theranostics*, 11(2), 614–648. <https://doi.org/10.7150/thno.47007>
- Zhang, T., Zheng, Q., Yi, X., An, H., Zhao, Y., Ma, S., & Zhou, G. (2018). Establishing RNA virus resistance in plants by harnessing CRISPR immune system. *Plant biotechnology journal*, 16(8), 1415–1423. <https://doi.org/10.1111/pbi.12881>
- Zhang, Y., Bai, Y., Wu, G., Zou, S., Chen, Y., Gao, C., & Tang, D. (2017). Simultaneous modification of three homoeologs of TaEDR1 by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 91(4), 714–724. <https://doi.org/10.1111/tpj.13599>
- Zhang, Y., Guo, W., Chen, L., Shen, X., Yang, H., Fang, Y., Ouyang, W., Mai, S., Chen, H., Chen, S., Hao, Q., Yuan, S., Zhang, C., Huang, Y., Shan, Z., Yang, Z., Qiu, D., Zhou, X., Cao, D., Li, X. Jiao, Y. (2022). CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis of GmUGT Enhanced Soybean Resistance Against Leaf-Chewing Insects Through Flavonoids Biosynthesis. *Frontiers in plant science*, 13, 802716. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.802716>
- Zhang, Y., Li, D., Zhang, D., Zhao, X., Cao, X., Dong, L., Liu, J., Chen, K., Zhang, H., Gao, C., & Wang, D. (2018). Analysis of the functions of TaGW2 homoeologs in wheat grain weight and protein content traits. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 94(5), 857–866. <https://doi.org/10.1111/tpj.13903>
- Zhang, Y., Li, J., Chen, S. et al. An APETALA2/ethylene responsive factor, OsEBP89 knockout enhances adaptation to direct-seeding on wet land and tolerance to drought stress in rice. *Mol Genet Genomics* 295, 941–956 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00438-020-01669-7>
- Zhang, Z., Ge, X., Luo, X., Wang, P., Fan, Q., Hu, G., Xiao, J., Li, F., & Wu, J. (2018). Simultaneous Editing of Two Copies of Gh14-3-3d Confers Enhanced Transgene-Clean Plant Defense Against Verticillium dahliae in Allotetraploid Upland Cotton. *Frontiers in plant science*, 9, 842. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00842>
- Zhang, Z.(A), Gao, L., Ke, M., Gao, Z., Tu, T., Huang, L., Chen, J., Guan, Y., Huang, X., & Chen, X. (2022). GmPIN1-mediated auxin asymmetry regulates leaf petiole angle and plant architecture in soybean. *Journal of integrative plant biology*, 64(7), 1325–1338. <https://doi.org/10.1111/jipb.13269>

- Zhang, Z.(B), Wang, J., Kuang, H. et al. Elimination of an unfavorable allele conferring pod shattering in an elite soybean cultivar by CRISPR/Cas9. *aBIOTECH* 3, 110–114 (2022). <https://doi.org/10.1007/s42994-022-00071-8>
- Zhang, Z., Zhang, X., Lin, Z., Wang, J., Liu, H., Zhou, L., Zhong, S., Li, Y., Zhu, C., Lai, J., Li, X., Yu, J., Lin, Z. A Large Transposon Insertion in the *stiff1* Promoter Increases Stalk Strength in Maize, *The Plant Cell*, Volume 32, Issue 1, January 2020, Pages 152–165, <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00486>
- Zhao, D., Li, J., Li, S. et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes. *Nat Biotechnol* 39, 35–40 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0592-2>
- Zhao, DS., Li, QF., Zhang, CQ. et al. GS9 acts as a transcriptional activator to regulate rice grain shape and appearance quality. *Nat Commun* 9, 1240 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03616-y>
- Zhao, X., Jayarathna, S., Turesson, H., Fält, A. S., Nestor, G., González, M. N., Olsson, N., Beganovic, M., Hofvander, P., Andersson, R., & Andersson, M. (2021). Amylose starch with no detectable branching developed through DNA-free CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of two starch branching enzymes in potato. *Scientific reports*, 11(1), 4311. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83462-z>
- Zhao, X., Meng, Z., Wang, Y. et al. Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers. *Nature Plants* 3, 956–964 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0063-z>
- Zheng, G., Ming, C. and Botella, J. R. 2021. "Non-GM Genome Editing Approaches in crops". *Frontiers in genome editing*. 2021. 3:817279. doi: 10.3389/fgeed.2021.817279
- Zheng M, Zhang L, Tang M, Liu J, Liu H, Yang H, Fan S, Terzaghi W, Wang H, Hua W. Knockout of two *BnaMAX1* homologs by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis improves plant architecture and increases yield in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant Biotechnol J*. 2020 Mar;18(3):644-654. doi: 10.1111/pbi.13228. Epub 2019 Aug 13. PMID: 31373135; PMCID: PMC7004912.
- Zheng, Zh.& Ye, G.& Zhou, Y. & Pu, X.& Su, W. & Wang, J.. (2021). Editing sterol side chain reductase 2 gene ( *StSSR2* ) via CRISPR/Cas9 reduces the total steroidal glycoalkaloids in potato. *All Life*. 14. 401-413. 10.1080/26895293.2021.1925358.
- Zhong Z, Liu S, Liu X, Liu B, Tang X, Ren Q, Zhou J, Zheng X, Qi Y, Zhang Y. Intron-Based Single Transcript Unit CRISPR Systems for Plant Genome Editing. *Rice (N Y)*. 2020 Feb 3;13(1):8. doi: 10.1186/s12284-020-0369-8. PMID: 32016614; PMCID: PMC6997322.
- Zhou Y, Xu S, Jiang N, Zhao X, Bai Z, Liu J, Yao W, Tang Q, Xiao G, Lv C, Wang K, Hu X, Tan J, Yang Y. Engineering of rice varieties with enhanced resistances to both blast and bacterial blight diseases via CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J*. 2022 May;20(5):876-885. doi: 10.1111/pbi.13766. Epub 2022 Jan 14. PMID: 34890109; PMCID: PMC9055821.
- Zhou, J., Peng, Z., Long, J., Sosso, D., Liu, B., Eom, J. S., Huang, S., Liu, S., Vera Cruz, C., Frommer, W. B., White, F. F., & Yang, B. (2015). Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 82(4), 632–643. <https://doi.org/10.1111/tpj.12838>
- Zhou, J., Wang, G., & Liu, Z. (2018). Efficient genome editing of wild strawberry genes, vector development and validation. *Plant biotechnology journal*, 16(11), 1868–1877. <https://doi.org/10.1111/pbi.12922>
- Zhou, J., Xin, X., He, Y. et al. Multiplex QTL editing of grain-related genes improves yield in elite rice varieties. *Plant Cell Rep* 38, 475–485 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2340-3>
- Zhu Haocheng, Li Chao and Gao Caixia, 2020. "Applications of CRISPR-Cas in agriculture and Plant biotechnology". *Nature reviews*. 2020. 21, 661-677.
- Zhu Y, Lin Y, Chen S, Liu H, Chen Z, Fan M, Hu T, Mei F, Chen J, Chen L, Wang F. CRISPR/Cas9-mediated functional recovery of the recessive *rc* allele to develop red rice. *Plant Biotechnol J*. 2019 Nov;17(11):2096-2105. doi: 10.1111/pbi.13125. Epub 2019 May 7. PMID: 31002444; PMCID: PMC6790373.
- Zsögön, A., Čermák, T., Naves, E. R., Notini, M. M., Edel, K. H., Weinl, S., Freschi, L., Voytas, D. F., Kudla, J., & Peres, L. (2018). De novo domestication of wild tomato using genome editing. *Nature biotechnology*, 10.1038/nbt.4272. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/nbt.4272>

## Références sitographiques

1. <https://www.eu-sage.eu/genome-search>
2. <https://www.lgseeds.fr/oleique-ou-linoleique-differences-et-complementarites>
3. <https://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/acrylamide>
4. [Fabrication-de-produits-amylaces.pdf \(chambres-agriculture.fr\)](#)
5. [Évaluation des semences et des variétés – GEVES](#)
6. <https://www.greenpeace.fr/espace-presse/nouveaux-ogm-julien-denormandie-ouvre-la-boite-de-pandore/>
7. <https://www.infogm.org/faq-qu-est-ce-que-la-mutagenese>
8. <https://www.biotechnologies-vegetales.com/inde-la-reglementation-sadapte-pour-booster-lagriculture/>
9. [https://www.ogm.gouv.qc.ca/information\\_generale/edition\\_genomique.html](https://www.ogm.gouv.qc.ca/information_generale/edition_genomique.html)
10. <https://www.europeanscientist.com/fr/opinion/nouvelles-techniques-genomiques-ngt-ouverture-de-la-commission-europeenne-un-defi-historique-pour-la-presidence-francaise-de-lue/>
11. [New plant-breeding techniques \(europa.eu\)](#)
12. <https://inspection.canada.ca/varietes-vegetales/vegetaux-a-caracteres-nouveaux/demandeurs/directive-dir-2000-07/fra/1304474667559/1304474738697>
13. [https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/BRIE/2020/659343/EPRS\\_BRI\(2020\)\\_659343\\_EN.pdf](https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/BRIE/2020/659343/EPRS_BRI(2020)_659343_EN.pdf)
14. <https://www.foodstandards.gov.au/consumer/gmfood/applications/Pages/default.aspx>
15. <https://allianceforscience.cornell.edu/blog/2018/01/argentina-and-brazil-merge-law-and-science-to-regulate-new-breeding-techniques/>
16. <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-173-2015-246978/texto>
17. <http://www.info-nbt.fr/2019/03/le-japon-fait-un-pas-de-plus-vers-les-nbt-quid-de-l-europe.html>
18. [https://food.ec.europa.eu/plants/genetically-modified-organisms/post-authorisation/monitoring-plans-and-reports\\_en](https://food.ec.europa.eu/plants/genetically-modified-organisms/post-authorisation/monitoring-plans-and-reports_en)
19. [OGM : les insectes deviennent inévitablement résistants \(notre-planete.info\)](#)
20. [Détection d'OGM dans un aliment - Les séries SMS, BSE et BGB \(ac-normandie.fr\)](#)
21. [PCR digitale : principe et applications \(edimark.fr\)](#)
22. [Séquençage nouvelle génération \(NGS\) Clinisciences](#)
23. [NGS : une nouvelle méthode d'analyse ADN pour des traitements personnalisés | Fondation contre le Cancer](#)
24. [https://www.ogm.gouv.qc.ca/reglementation/etiquetage/etiquetage\\_international.html#:~:text=Au%20niveau%20international%2C%20il%20n%E2%80%99existe%20actuellement%20aucune%20norme,concerne%20les%20additifs%2C%20les%20contaminants%20et%20les%20r%C3%A9sidus;](https://www.ogm.gouv.qc.ca/reglementation/etiquetage/etiquetage_international.html#:~:text=Au%20niveau%20international%2C%20il%20n%E2%80%99existe%20actuellement%20aucune%20norme,concerne%20les%20additifs%2C%20les%20contaminants%20et%20les%20r%C3%A9sidus;)
25. <https://cordis.europa.eu/project/id/501986/reporting>
26. [INRA – résultats SIGMEA coexistence cultures OGM et non-OGM ; Home page – 5. Generic gene flow modelling platform \(inrae.fr\)](#)
27. <https://www.hutton.ac.uk/research/departments/information-and-computational-sciences/tools/landsfacts>
28. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/fr/>
29. <https://www.consoglobe.com/ogm-quels-pays-autorises-interdits-cg>
30. <https://www.centerforfoodsafety.org/ge-map/#>
31. [https://www.ogm.gouv.qc.ca/reglementation/etiquetage/etiquetage\\_autres\\_pays.html](https://www.ogm.gouv.qc.ca/reglementation/etiquetage/etiquetage_autres_pays.html)

32. [La situation des OGM en France | ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire](#)
33. [fi-bl-ifoam-mm-MONDE-2022-02-15-FRANCAIS-grafiken.pptx \(live.com\)](#)
34. [Breeding position paper v01 web 0.pdf \(ifoam.bio\)](#)
35. [https://www.organicseurope.bio/content/uploads/2020/06/ifoameu\\_kqof\\_socioeconom icstudy\\_printversion\\_20180417\\_web\\_0.pdf?dd](#)
36. [https://www.semae-pedagogie.org/sujet/gestion-des-ressources-genetiques/](#)
37. [https://www.fao.org/cgrfa/topics/plants/fr/](#)
38. [https://www.geves.fr/ressources-phytogenetiques/qui-sont-les-gestionnaires-officiellement-reconnus-queles-ressources-sont-versees-dans-la-collection-nationale/](#)
39. [https://www.biotechnologies-vegetales.com/webinaire-2022/, AFBV ; https://www.youtube.com/watch?v=KvPkBbWT8T, Académie d'Agriculture](#)
40. [https://blog.addgene.org/crispr-101-cas9-nickase-design-and-homology-directed-repair](#)
41. [https://www.dictionnaire-medical.net/term/10910,1,xhtml](#)
42. [https://www.inserm.fr/actualite/epitranscriptome-code-invisible-sur-arn-controle-progression-tumorale/](#)
43. [https://www.lalanguefrancaise.com/dictionnaire/definition/epimutation](#)
44. [https://www.infogm.org/7418-oligonucleotide-modifier-genetiquement-ou-tracer-les-aliments; Microsoft Word - NOSB petition cover letter final.docx \(usda.gov\)](#)
45. [Microsoft Word - NOSB petition cover letter final.docx \(usda.gov\)](#)
46. [https://www.semae-pedagogie.org/sujet/retrocroisement/](#)
47. [L'hybridation - SEMAE Pédagogie \(semae-pedagogie.org\)](#)
48. [https://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/acrylamide](#)
49. [Oléique ou linoléique : Différences et complémentarités \(lgseeds.fr\)](#)
50. [Impacts des produits phytopharmaceutiques sur la biodiversité et les services écosystémiques : résultats de l'expertise scientifique collective INRAE-lfremier | INRAE INSTIT](#)
51. [https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352407322000191?via%3Dihub](#)
52. [biotique - Définitions, synonymes, conjugaison, exemples | Dico en ligne Le Robert](#)
53. [abiotique - Définitions, synonymes, conjugaison, exemples | Dico en ligne Le Robert](#)
54. [Les organismes génétiquement modifiés \(OGM\) | Ministères Écologie Énergie Territoires \(ecologie.gouv.fr\)](#)
55. [https://www.geves.fr/informations-toutes-especes/queles-sont-les-reglementations/protection-intellectuelle-varietes/](#)
56. [https://www.horticulture.red/fr/expertise/qualite/metabolites-secondaires/](#)
57. [https://www.gammvert.fr/conseils/conseils-de-jardinage/lutte-biologique-utiliser-les-insectes-auxiliaires](#)
58. [https://www.arvalis.fr/sites/default/files/imported\\_files/selected\\_5\\_sigmea8022822910\\_590864932.pdf](#)
59. [https://sanatech-seed.com/en/20210915-2/](#)

## Annexe 1 : Lettre de cadrage de la saisine

Saisine Comité Scientifique CTPS 2021

**NBT**

### **Contexte**

En 2016, le Comité Scientifique du CTPS a mené une première étude sur les nouvelles techniques de sélection des plantes (NBTs), notamment les techniques d'édition du génome, afin de répondre aux questions suivantes :

- Quels sont les impacts potentiels de ces nouvelles techniques de sélection des plantes sur l'offre variétale ?
- Quels pourraient être les impacts de ces nouvelles techniques de sélection des plantes sur les activités du CTPS ?<sup>1</sup>

Depuis, un arrêt de la Cour de Justice de l'Union européenne (CJUE) du 25 juillet 2018 sur la mutagenèse a clarifié le statut juridique des produits issus de NBT au regard de la réglementation OGM. Ceux-ci sont soumis aux obligations de la réglementation OGM : évaluation des risques, autorisation, traçabilité, étiquetage, surveillance.

A la demande du Conseil, la Commission a publié le 29 avril 2021 une étude sur le statut des NBT dans le droit de l'UE<sup>2</sup>. L'étude conclut que la réglementation actuelle n'est pas adaptée pour certaines NBT et leurs produits, et qu'il est donc nécessaire de l'adapter aux progrès scientifiques et technologiques.

La Commission a annoncé une action politique sur les plantes issues de mutagenèse ciblée et de cisgénèse<sup>3</sup>. Il s'agirait d'adapter les procédures d'autorisation et d'évaluation des risques ainsi que les exigences de traçabilité et d'étiquetage, tout en maintenant un haut niveau de protection de la santé et de l'environnement. Cette initiative fera l'objet d'une étude d'impact qui pourra déboucher sur une modification du cadre réglementaire européen. Les différentes options réglementaires ne sont pas encore définies et seront explorées lors de l'étude d'impact. Dans ce contexte, un éclairage du Comité Scientifique du CTPS est sollicité sur les NBTs, au titre de l'action 25 du plan SPAD-2 sur la mobilisation des acquis scientifiques disponibles pour l'élaboration ou l'évolution des cadres réglementaires.

Le besoin d'éclairage concerne en particulier l'évaluation des finalités des variétés issues de NBT au regard des objectifs de la transition agro-écologique.

En effet, l'étude de la Commission européenne soulève la question de l'évaluation des bénéfices des produits issus de NBT pour la durabilité afin de contribuer aux objectifs du pacte vert pour l'Europe et des stratégies « De la ferme à la table » et de biodiversité. Lors du Conseil Agriculture des 26-27 mai 2021, le Ministre chargé de l'agriculture a également mis en avant l'importance de la finalité des variétés issues de NBTs. Il a précisé que cette finalité doit être cohérente avec les priorités de transition écologique de l'agriculture et de souveraineté alimentaire, par exemple des plantes qui résistent mieux à la sécheresse pour réduire la consommation d'eau, ou qui résistent à des ravageurs pour réduire le recours aux pesticides. Il considère à l'inverse que développer de nouvelles variétés tolérantes aux herbicides ne serait pas souhaitable.

<sup>1</sup> Rapport du CTPS de 2016, publié en février 2018 : [https://www.geves.fr/wp-content/uploads/CTPS\\_CS\\_Etude\\_NBT\\_difCP-CS\\_Fev18.pdf](https://www.geves.fr/wp-content/uploads/CTPS_CS_Etude_NBT_difCP-CS_Fev18.pdf)

<sup>2</sup> Rapport de la Commission [https://ec.europa.eu/food/system/files/2021-04/gmo\\_mod-bio\\_ngt\\_eu-study.pdf](https://ec.europa.eu/food/system/files/2021-04/gmo_mod-bio_ngt_eu-study.pdf)

<sup>3</sup> Lettre de la Commission à la Présidence portugaise [https://ec.europa.eu/food/system/files/2021-04/gmo\\_mod-bio\\_ngt\\_letter.pdf](https://ec.europa.eu/food/system/files/2021-04/gmo_mod-bio_ngt_letter.pdf)



## Objectifs et questions posées

L'expertise scientifique qui sera conduite par le Comité Scientifique devra porter sur les trois volets suivants :

- **Une actualisation du rapport de novembre 2016 au regard des développements techniques intervenus depuis.**

Dans le cadre de l'étude publiée par la Commission européenne le 29 avril 2021, le Centre commun de recherche (JRC) a réalisé un état des lieux des avancées technologiques et des applications actuelles et futures<sup>4</sup>.

Cet état des lieux fait ressortir que les NBT principalement utilisées sont celles faisant intervenir la technologie CRISPR/Cas, que ces techniques évoluent rapidement et qu'il faut s'attendre à ce que de nouvelles techniques soient développées dans les années à venir. D'après l'étude de la Commission, deux plantes issues de NBT sont commercialisées, un soja à teneur élevée en acide oléique aux Etats-Unis, et une tomate enrichie en GABA au Japon. 15 autres plantes sont au stade pré-commercial, 117 sont à un stade avancé de recherche et développement et 292 à un stade plus précoce.

Le Comité Scientifique examinera si ces développements techniques sont susceptibles de modifier son analyse de 2016 sur les conséquences possibles des NBT sur l'offre variétale, et actualisera le Cas échéant cette analyse.

- **Un approfondissement de la réflexion sur l'évaluation des variétés issues de NBT**

Le rapport du CTPS de 2016 abordait la question de l'évaluation des services et disservices des traits nouveaux.

Le Comité Scientifique du CTPS poursuivra la réflexion sur ce sujet en proposant des critères permettant de déterminer si le trait développé par une NBT présente des avantages ou des inconvénients (services ou disservices) au regard des objectifs de la transition agro-écologique en prenant en compte les pratiques associées au trait développé et la compatibilité de la variété avec les systèmes agro-écologiques. La réflexion concernera en particulier les traits susceptibles d'être développés par les techniques de mutagenèse ciblée et de cisgenèse.

Le Comité Scientifique du CTPS identifiera les études et méthodologies nécessaires pour évaluer les variétés selon ces critères et examinera leur faisabilité dans le cadre de l'inscription au catalogue en termes de coût et de durée. La réflexion pourra s'appuyer sur des exemples.

Compte tenu de l'importance de critères et méthodes d'évaluation des variétés communs au niveau européen, cette réflexion sur l'évaluation des services et disservices des variétés issues de NBT sera conduite dans la perspective d'une application au niveau européen.

- **Une étude sur l'incidence de la mise en marché de variétés issues de NBTs, en termes de coexistence de deux types de variétés, et de Propriété Intellectuelle**

La mise en marché de variétés issues de NBT aura pour conséquence la coexistence sur le marché de variétés issues de NBTs, et de variétés non issues de NBTs.

Sur la base de réflexions antérieures sur la coexistence de variétés OGM et non OGM, le Comité Scientifique du CTPS identifiera l'impact potentiel de la coexistence de variétés issues de NBT et non issues de NBT sur les filières de production et de transformation, et sur l'exploitation des variétés.

La Propriété Intellectuelle des variétés issues de NBT pourrait relever de COV sur les variétés et de brevets sur les méthodes utilisées pour obtenir les variétés.

Le Comité Scientifique étudiera l'incidence de ces modalités de PI sur le marché des semences, et sur l'Essentiel Dérivation des Variétés.

---

<sup>4</sup> Rapports du JRC : <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/5a661f2b-a180-11eb-b85c-01aa75ed71a1/language-en> ; <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC123830>

## Programme envisagé : structuration et calendrier

### Structuration

L'expertise scientifique sera structurée en 5 Workpackages :

Le **WP1** s'attachera à examiner **si les développements techniques récents sont susceptibles de modifier l'analyse de 2016** sur les conséquences possibles des NBT sur l'offre variétale, et actualisera le Cas échéant l'analyse de 2016.

Le **WP2** traitera de **l'évaluation des services et disservices des variétés issues de NBTs, en proposant des critères** permettant de déterminer si le trait développé par NBT, en particulier mutagenèse ciblée et cisgenèse, présente des avantages ou des inconvénients (services ou disservices) au regard des objectifs de la transition agro-écologique en prenant en compte les pratiques associées au trait développé et la compatibilité de la variété avec les systèmes agro-écologiques.

Le **WP3 identifiera le type d'études** qu'il faudrait mettre en place pour évaluer les variétés selon ces critères et **examinera leur faisabilité** dans le cadre de l'inscription au catalogue en termes de coûts et de durée, dans la perspective d'une application au niveau européen.

Le **WP4** portera sur la **coexistence** de variétés issues de NBT et de variétés non issues de NBTs, et de l'incidence de cette coexistence sur les filières et les exploitations, en se basant sur l'exemple de la coexistence OGM/non-OGM.

Le **WP5** sera axé sur la question de la **Propriété Intellectuelle** des variétés issues de NBTs, et de l'incidence des différents types de PI sur le marché et sur l'Essentiel Dérivation des Variétés.

### Calendrier

Cette étude démarrera en décembre 2021.

Le travail commencera par le WP1. Les autres WPs seront réalisés après le WP1.

Une journée de réflexion du Comité Scientifique consacrée à l'évaluation des services et disservices des variétés sera organisée au 1<sup>er</sup> semestre 2022. Un ou des experts d'autres pays de l'UE seront associés à la réflexion.

Sur la base de ces échanges, les réflexions concernant l'évaluation des services et disservices des variétés seront menées jusqu'en octobre 2022.

Les conclusions générales de cette saisine seront rédigées et présentées au Comité plénier du CTPS à l'automne 2022.

|                                       | M2       | M3        | M4       | M5        | M6       | M7       | M8        | M9        | M10       | M11       | M12      |
|---------------------------------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
|                                       | Déc-2021 | Janv-2022 | Fév-2022 | Mars-2022 | Avr-2022 | Mai-2022 | Juin-2022 | Juil-2022 | Août-2022 | Sept-2022 | Oct-2022 |
| <b>WP1 : actualisation</b>            |          |           |          |           |          |          |           |           |           |           |          |
| <b>WP2 : critères d'évaluation</b>    |          |           |          |           |          |          |           |           |           |           |          |
| <b>WP3 : méthodes d'évaluation</b>    |          |           |          |           |          |          |           |           |           |           |          |
| <b>WP4 : coexistence</b>              |          |           |          |           |          |          |           |           |           |           |          |
| <b>WP5 : propriété intellectuelle</b> |          |           |          |           |          |          |           |           |           |           |          |

## Annexe 2 : Evolutions détaillées des NBT et des techniques d'édition du génome depuis 2016

### 2.1. L'évolution des NBT et des techniques d'édition du génome depuis 2016

#### 2.1.1. Augmentation du nombre de cibles potentielles :

##### ❖ Grâce à la découverte de différents PAMs

Le Protospacer adjacent motif (PAM) est une courte séquence de nucléotides, composée de 3 à 6 paires de bases, présente sur l'ADN cible et reconnue par la nucléase Cas. La coupure précise réalisée par la protéine dépend de la combinaison de deux événements consécutifs, la détection du motif PAM dans la séquence cible et la reconnaissance analogique de la séquence de l'ARN guide qui lui est associée (Colias et Beisel, 2021). Jusqu'alors, la faible diversité des séquences PAMs, associées à la Cas9, était un élément limitant dans l'édition du génome, par l'absence de motifs compatibles proches de la séquence ciblée.

Pour élargir l'éventail d'utilisation du système CRISPR/Cas, des recherches ont été menées pour trouver des protéines homologues et orthologues à la Cas9, avec des profils PAM différents. La construction sgRNA/Cas est naturellement présente dans la défense immunitaire des bactéries et des archées et consiste en un système protéique d'une grande diversité (Camerlengo *et al.*, 2022).

Cette multiplicité, additionnée à la modification du domaine d'interaction PAM (PID : PAM Interacting Domain) (Chen *et al.*, 2019), a amené une diversité de motifs PAMs reconnus et donc utilisables, levant un peu plus les contraintes liées à cette spécificité. Ces découvertes permettent de rendre accessibles des parties du génome jusqu'alors inaccessibles pour réaliser des actions ciblées sur l'ADN.

##### ❖ Grâce à la création d'une Cas9 PAMless.

Les efforts réalisés pour élargir la gamme des motifs PAMs reconnus par le système CRISPR/Cas ont permis de lever des contraintes dans le spectre des séquences accessibles aux modifications ciblées. Cependant, une partie du génome demeure encore inaccessible, et ce en raison de leur position trop éloignée des motifs PAMs répertoriés. La question qui se pose alors est de savoir s'il est possible de se passer d'un motif PAM pour mener des actions ciblées sur l'ADN.

Des études ont abouti à la conception de différents variants de la SpyCas9 (*Staphylococcus pyogenes* Cas9) :

- Le variant SpG, modifie la séquence de reconnaissance d'origine, de type NGG PAM en motif NGN PAM et permet ainsi d'être compatible à un plus grand nombre de séquences nucléotidiques
- Le variant SpRY permet de s'affranchir d'avantage d'une dépendance à un motif donné, puisqu'il permet d'obtenir une reconnaissance de sites de type NRN PAMs (où R =A, G) et NYN PAMs (où Y = C, T) (Walton *et al.*, 2020).
- D'autres variants sont apparus avec l'utilisation d'un orthologue Cas9, issu de *Francisella novicida* (FnCas9), modifiant le NGG PAM en YG (Y = C, T) (Colias et Beisel, 2021).

En bonne voie vers une utilisation du système CRISPR/Cas indépendant d'une séquence PAM restrictive, les efforts pour créer des sites de reconnaissance dits PAMless (moins

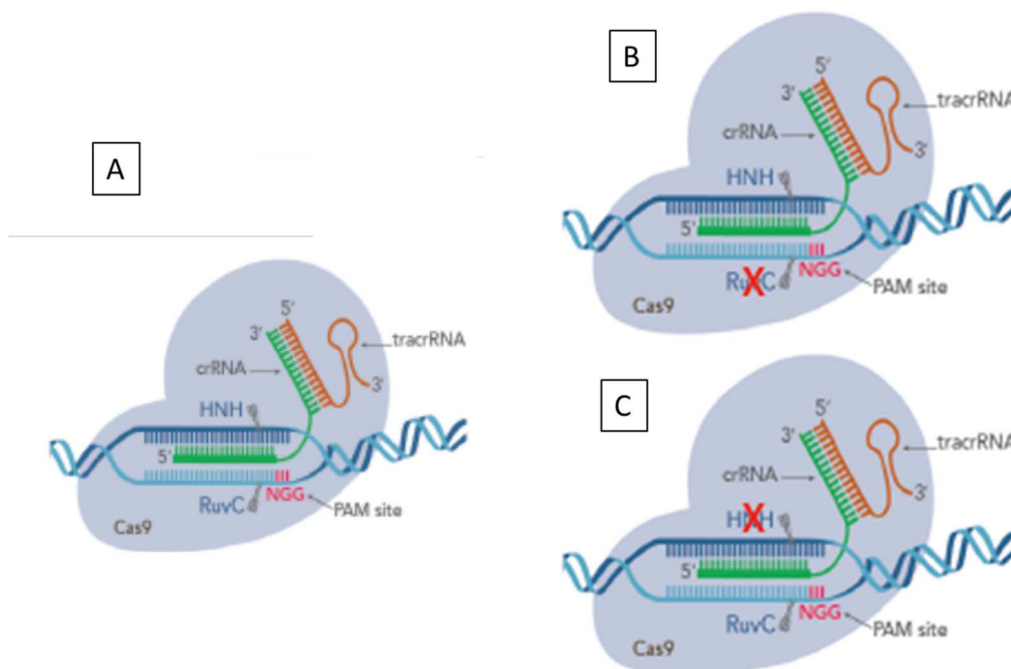
spécifiques), sont en passe de rendre accessibles toutes les séquences du génome aux techniques d'édition. La spécificité passe alors par la séquence d'ARN guide associée au complexe CRISPR/Cas. Pour ce faire, des études doivent être menées pour affiner cette méthode (Tang, 2020), pour gagner en spécificité et ainsi, éviter les mutations hors cibles (off-target).

## 2.1.2. Base editing systems (éditeur de bases)

Des nouvelles méthodes d'édition du génome permettent aujourd'hui la modification ciblée d'une base de l'ADN grâce aux systèmes nommés « Cytosine Base Editor » (CBE) et « Adenine Base Editor » (ABE). Leurs mécanismes généraux sont basés sur l'association d'une nucléase nCas9 avec une désaminase, de type cytosine (CBE) ou adénine (ABE). Cette association va induire une coupure ciblée d'un brin de l'ADN puis une modification d'une base de C en T (C : G > T : A) ou de A en G (A : T > G : C) (Chen *et al.*, 2019).

### ❖ Utilisation d'une nCas9 Cas plus spécifique que la Cas9 :

Les nouvelles techniques d'édition du génome, qui seront détaillées ci-dessous, utilisent une protéine Cas9 modifiée dite « nickase » (nCas9). Contrairement à la Cas9 d'origine, d'activité « DSB » (Double-Strand Break), capable de cliver le double brin d'ADN, sa version mutée permet une découpe monobrin. Pour rappel, la structure originelle de la nucléase Cas9 est composée d'une architecture bilobée, incluant un large lobe de reconnaissance (REC) et d'un lobe plus petit constitué d'une nucléase (NUC). Le site NUC est composé d'un PAM Interacting Domain (PID) et de deux domaines de clivage, le RuvC et le HNH, dont chacun coupe un brin de l'ADN ciblé, trois nucléotides en amont de la séquence PAM. Le lobe REC contribue, quant à lui, à activer la protéine Cas quand elle est associée avec l'ARN guide. La nCas9 peut être obtenue de deux façons, en désactivant le domaine RuvC, dont le mutant est nommé nCas9 D10A, ou par inactivation du domaine HNH, appelé nCas9 H840A (Camerlengo *et al.*, 2022).



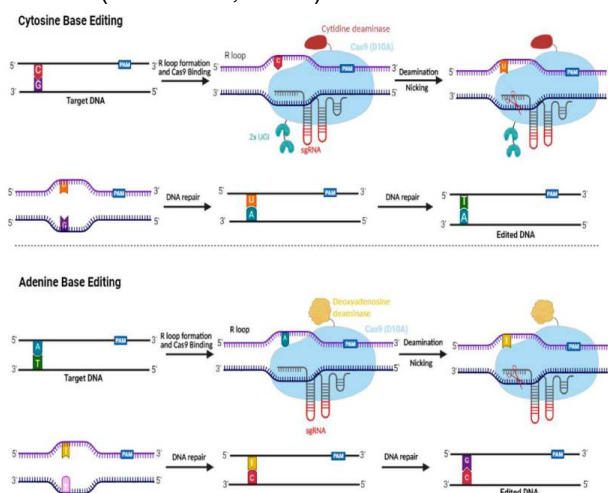
**Figure 3** Schémas représentant la protéine cas9 avec son ARN guide, représentant sa capacité nucléasique (d'après [40\*]). **A)** représentation d'une Cas9 active, avec ces deux sites de clivages actifs. **B)** Représentation d'une nCas9 D10A, dont le domaine RuvC est muté le rendant inactif. La nucléase mutée peu réaliser une coupe simple brin uniquement. **C)** Représentation d'une nCas9 H840A, dont le site de clivage HNH est inactivé. La coupe de l'ADN se fera que sur 1 brin. CrRNA et TracrRNA forment l'ARN guide. Le site PAM a pour séquence NGG (N = A, T, G ou C).

### ❖ Cytosine Base Editor (CBE)

La méthode CBE « Cytosine Base Editor », permet la modification précise d'une cytosine en thymine, par l'action d'une nCas9 D10A, de la cytidine désaminase et deux enzymes, l'Uridine Glycosylase Inhibitor (UGI) et l'uracile ADN glycosylase (UDG = Uracil DNA Glycosylase). L'ARN guide, associé à la nCas9, va se fixer sur un seul brin de l'ADN cible (comme la forme active de la Cas9), induisant la formation d'une boucle dite « R-loop » (Das *et al.*, 2022). Le brin non fixé par le complexe ARNguide-nCas9, va subir une modification de la cytosine en uracile, par l'enzyme cytidine désaminase. Dans un même temps, l'action de l'uridine glycosylase inhibiteur (UGI) va inhiber l'activité de l'UDG, maintenant l'uracile dans la structure (Chen *et al.*, 2019). Parallèlement, la nucléase nCas9 va cliver l'autre brin de l'ADN. Lors de la réparation de l'ADN, le segment modifié par la cytidine désaminase, va être pris comme modèle pour « restaurer » la séquence coupée, créant une Adénine, par complémentarité. L'uracile sera converti en thymine pendant le processus de réplication. Ainsi la CBE aura permis la modification ciblée d'une cytosine en thymine (C : G>T : A). Cette modification ciblée de l'ADN a montré une grande efficacité. Additionnée à la découverte de Cas9 aux motifs PAMs plus diversifiés, cela permet l'induction de mutations ciblées et prédictibles avec une flexibilité d'action accrue (Das *et al.*, 2022).

### ❖ Adenine Base Editor (ABE)

Sur le même principe que le CBE, le système ABE (Adénine Base Editor) permet la modification d'une base adénine en guanine (A : T>G :C). Pour ce faire, elle nécessite l'action combinée d'une nCas9 D10A et d'une adénosine désaminase, utilisée comme effecteur (Chen *et al.*, 2019). Contrairement à la CBE, la désamination d'une adénine sur l'ADN simple brin n'existant pas naturellement, une version modifiée de l'enzyme TadA provenant d'*Escherichia coli* a été utilisée et nommée ecTadA (Das *et al.*, 2022). Le mécanisme en jeu est sensiblement proche du système CBE. Il débute par la reconnaissance et la fixation du complexe sgRNA-nCas9 sur un brin de l'ADN, créant la formation d'une boucle. La modification de l'adénine en inosine va se faire sur le brin libre complémentaire par l'enzyme ecTadA. Lors de la réparation et de la réplication de l'ADN, l'inosine va être corrigée en guanine (Zhu *et al.*, 2020). Le CBE est reconnu très efficace dans la modification induite, alors que le ABE semble montrer une efficacité moindre. Une huitième version améliorée du système ABE est en cours de développement (Das *et al.*, 2022).



**Figure 4 Mécanisme de l'édition de bases (CBE et ABE) (d'après Das *et al.*, 2022).** La « *cytosine Base Editing* » (panneau supérieur) : La protéine nCas9 spécifique à l'ADN Simple brin est attachée à une cytidine désaminase qui convertit la cytosine en uracile. Une boucle R-loop sur l'ADN est formée lorsque Cas se lie à un ARN guide, et la cytidine désaminase liée convertit les cytosines accessibles en uracile. Le clivage du brin non édité, la réparation de l'ADN du brin non édité, tandis que l'inhibiteur de la glycosylase d'uracile (UGI) obstrue la réparation de l'excision de la base de l'uracile, facilitant les modifications C en T. « *Adenine Base Editing* » (panneau inférieur) : un monomère TadA est attaché à une protéine nCas9. Un ARN guide personnalisé se lie à la Cas, formant une boucle (R-loop) sur l'ADN dans laquelle le monomère TadA lié convertit les adénosines accessibles en inosine. Il y a formation d'un A en G.

#### ❖ STEME (Saturated targeted endogenous mutagenesis editor)

L'union des méthodes ABE et CBE a permis le développement d'une troisième méthode nommée STEME pour « Saturated targeted endogenous mutagenesis editor ». Elle est capable de modifier simultanément une cytosine en thymine (C: G > T: A) et une adénine en guanine (A: T > G: C). Elle se caractérise par la fusion d'une cytidine désaminase (APOBEC3A), d'une Adénosine désaminase (ecTadA–ecTadA\*(\*variant)) et de l'uridine glycosylase inhibitor (UGI) avec une nCas9 (D10A), le tout se faisant avec un unique sgRNA. Le STEME effectue la désamination de la cytidine et de l'adénine en uridine et en inosine. Ces changements sont copiés lors de la réparation et la réplication de l'ADN. Ces actions synchronisées permettent ainsi la substitution et la fixation ciblée des deux bases en thymine et guanine (Azameti *et al.*, 2021 ; Zhu *et al.*, 2020)

#### ❖ Induction d'une délétion ciblée (AFID : APOBEC – Cas9 fusion induced deletion system)

Cette méthode a été développée en s'inspirant du système CBE pour réaliser de courtes délétions ciblées du génome (Wang S. (A) *et al.*, 2020). Pour ce faire, une Cas9 dite « active », c'est-à-dire capable de couper le double brin de l'ADN (DSB = Double-Strand Break), est utilisée à laquelle ont été fusionnées une cytidine désaminase et une UDG. Comme évoqué précédemment dans le CBE, l'UDG est inhibée par la UGI, permettant la conservation de l'uridine dans la structure. Ici, le choix se porte sur la surexpression de l'UDG qui va permettre le retrait de l'uridine, laissant une place vacante nommée « site AP » (apurinique/apyrimidique) (Azameti *et al.*, 2021). Des enzymes APlyases vont venir couper ce site abasique sur un seul brin de l'ADN. La Cas9 va, quant à elle, couper le double brin de l'ADN, induisant la délétion précise de la séquence simple brin, entre le site de la cytidine délétée et la cassure induite par la Cas9 (3 pb avant le PAM). L'autre brin est simplement coupé par la Cas9. Il y a alors résection des extrémités 5' de l'ADN incompatibles puis réparation (Zhu *et al.*, 2020).

#### ❖ Transversion base editors

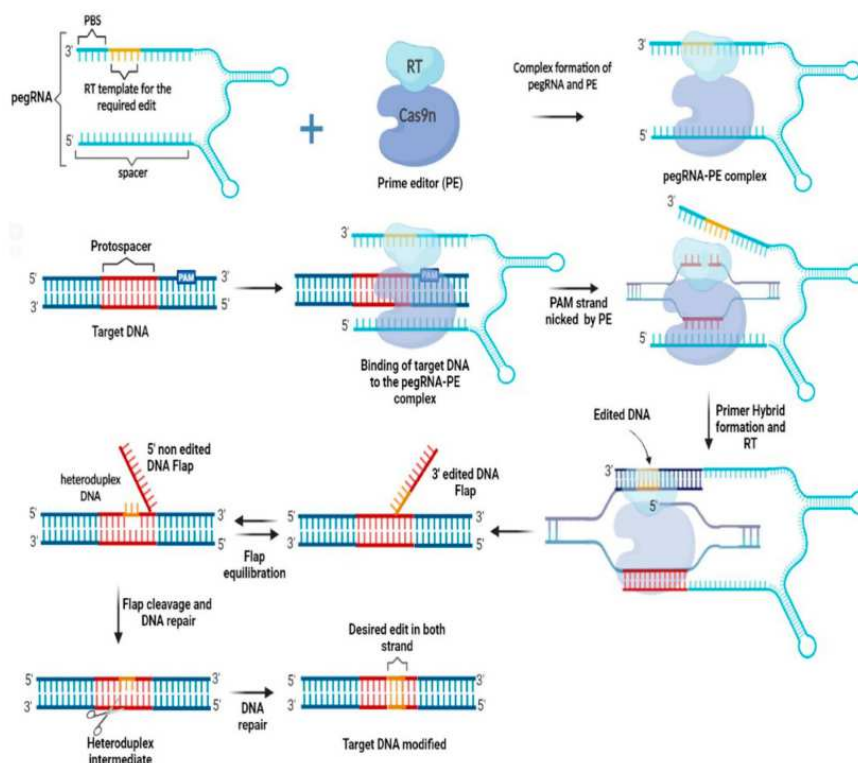
Les méthodes CBE, ABE et STEME permettent le remplacement d'une base purine avec une autre purine (adénine et guanine) et d'une pyrimidine avec une autre pyrimidine (thymine et cytosine), cela est appelé une transition. La transversion est le remplacement d'une purine par une pyrimidine ou d'une pyrimidine par une purine. Plusieurs méthodes ont été développées pour permettre une transversion d'une cytidine en guanine. La première détaillée ici se nomme « C-to-G Base Editors » (CGBE) et consiste en la fusion d'une nCas9(D10A) avec une cytidine désaminase et l'uracile ADN glycosylase (UDG). Sur le même principe que le CBE et la méthode de délétion susmentionnée, la cytidine désaminase va permettre la transformation de la cytosine en uridine. Cette dernière sera retirée sous l'action de l'UDG, laissant une place vacante en ce site. La nCas9 va, quant à elle, sectionner l'autre brin de l'ADN, suscitant la mise en œuvre de la réparation de l'ADN et de ses mécanismes de réplication. Cela va permettre l'introduction d'une guanine (Azameti *et al.*, 2021).

Plus récemment, deux autres méthodes dérivées ont vu le jour, la CGBE1 et miniCGBE1, qui permettent la transversion d'une guanine en cytosine avec une efficacité de l'ordre de 71.5%. La première, CGBE1 permet la transversion de C en G, avec une réduction du niveau de C-en-W (W = A ou T) et des mutations indels (insertion /délétion) non désirées. Elle consiste en la fusion d'une nCas9 avec une UDG dérivée d'*E. coli* (eUDG) et un variant de la cytidine désaminase du rat (APOBEC1 variant R33A). Elle a montré une réduction des off-targets (Kurt *et al.*, 2021). Le mini CGBE1, est constitué des mêmes éléments que le CGBE1 sans le eUDG. Par ce fait, il a été constaté une réduction des indels avec une légère baisse d'efficacité dans l'édition recherchée (Azameti *et al.*, 2021).

Une autre étude a permis la transversion d'un C en A, chez *E. coli*. Cette stratégie, nommée Glycosylase Base Editors (GBEs), utilise la même méthode que celles développées précédemment. Il y a fusion d'une nCas9 avec une activation-induced cytidine deaminase (AID) et d'une UDG. L'UDG va exciser la base U créée par la désaminase, formant un site AP, ce qui va initier les processus de réparation de l'ADN. Il y a un changement d'un C en A (Zhao D. *et al.*, 2021).

### 2.1.3. Prime editing

La méthode de prime editing permet d'induire des insertions, des délétions et des transversions des 4 bases de l'ADN sans nécessiter de coupure double brin de l'ADN (Das *et al.*, 2022). Développée en 2019, elle a permis, sur cellule humaine, la substitution de 12 bases, l'insertion de 44 paires de bases et la délétion de 80 paires de bases (Zhu *et al.*, 2020). Son action combine l'utilisation d'une nCas9 H840A (cf: figure 3), d'une reverse transcriptase et d'un prime editing guide RNA (pegRNA). Le pegRNA est composé d'une séquence dite « PBS » pour « primer-Binding Site », d'une séquence « modèle » pour la reverse transcriptase (le RT template), composée des modifications souhaitées sur l'ADN ciblé, et d'une région « spacer », », similaire à un sgRNA, contenant la séquence complémentaire de l'ADN (Das *et al.*, 2022). Le principe général de cette méthode est la coupure ciblée d'un seul brin de l'ADN par la nCas9, le pegRNA va se fixer sur la zone coupée, s'hybrider en partie avec le brin d'ADN complémentaire et servir de substrat pour la Reverse transcriptase. Cette dernière va ainsi commencer à synthétiser et réparer la molécule d'ADN coupée en copiant l'information ajoutée à la molécule pegRNA et ainsi permettre, par de multiples étapes de ligature et de réparation, de modifier, d'insérer, de modifier ou de déléter des bases sur l'ADN double brin (Zhu *et al.*, 2020). Pour augmenter la taille de la délétion, une stratégie nommée « PRIME-Del » consiste à utiliser des paires de pegRNA qui ciblent des brins d'ADN opposés. Chaque pegRNA code les sites à entailler à chaque extrémité de la délétion prévue avec une partie 3', complémentaire à l'autre pegRNA. Cela permet de créer des délétions plus longues (100 pb) et augmenter l'efficacité (Choi J. *et al.*, 2022). Une variante relativement nouvelle de PE a été signalée, nommée TwinPE, qui utilise deux pegARN, chacun ciblant un brin d'ADN différent. L'avantage de cette technique est la possibilité d'insérer des séquences exogènes beaucoup plus grandes, par rapport à l'insertion réalisable avec le PE conventionnel (Anzalone *et al.*, 2022).



**Figure 5 Mécanisme de la méthode de "Prime Editing" (D'après Das *et al.*, 2022).** Dans le mécanisme général, il y a la combinaison d'une nCas9 et d'une Reverse Transcriptase (RT) et d'un prime editing guide RNA (pegRNA), constituent l'outil d'édition principal (pegRNA). À l'extrémité 3' du modèle de transcription inverse, le pegRNA porte les modifications requises. Le site de liaison de l'amorce (PBS) se fixe au brin d'ADN entaillé, ce qui permet au modèle d'être transcrit inversement dans la séquence d'ADN appropriée. Les nucléotides modifiés sont ensuite placés avec précision dans l'emplacement cible.

## 2.1.4. Régulation de l'expression des gènes par CRISPR/Cas

Dans cette application du système CRISPR/Cas9, l'utilisation d'une deadCas9 (dCas9) est privilégiée. Il s'agit d'une Cas 9 dite « inactive » dont les deux domaines de clivage sont mutés pour inhiber leur action (Cf : figure 3). L'utilisation de cette dCas9 permet ainsi de ne plus couper mais de guider vers une séquence précise. Pour rappel, la WTCas9 (wild type = sauvage (originel)) est composée de deux domaines de clivage, capables de couper le double brin d'ADN ciblé, à proximité de la séquence PAM (Adli, 2018).

La dCas9, telle une plateforme de recrutement peut, par sa fixation ciblée, être à la base d'interférence ou de nombreuses actions menées sur l'ADN grâce à la fusion avec différentes enzymes impliquées dans la modification de l'ADN et de la chromatine.

### *Inhibition de l'expression d'un gène : CRISPR interference*

Par sa seule présence, la dCas9 peut induire une interférence dans les processus transcriptionnels de l'ADN empêchant l'expression du gène ciblé. Par sa simple fixation sur le double brin, elle gêne l'accès des protéines fixatrices de l'ADN comme les facteurs de transcription (Larson *et al.*, 2013). Si elle est fusionnée à un répresseur tel que le Kruppel-associated Box (KRAB), cela amplifie la répression du gène ciblé. Cette action d'interférence à l'expression d'un gène par le complexe CRISPR/dCas9 est aussi appelée CRISPRi (CRISPR interference) (Adli, 2018).

### *Activation / amplification de l'expression d'un gène : CRISPR activator*

A l'inverse, le CRISPRa (CRISPR activator) consiste dans le recrutement d'activateurs transcriptionnels par la dCas9, afin de booster l'expression du gène ciblé. L'augmentation de l'expression d'un gène peut être également réalisée par la fusion tripartite d'effecteurs tels que des activateurs transcriptionnels. L'accumulation des effecteurs peut se faire soit par une fusion à la dCas9, comme vu précédemment, ou soit à la sgRNA par un jeu de construction composé de modules d'ARN de type MS2, aptamères (oligonucléotides) en épingle à cheveux qui se lient spécifiquement à une protéine MCP (Bactériophage MS2-coat protein). Cette protéine MCP va être fusionnée à l'effecteur (Adli, 2018).

Une autre approche appelée SAM (Synergistic Activation Mediator), consiste à combiner les deux stratégies développées précédemment. Dans ce cas, la dCas9 est fusionnée à un effecteur1 et l'ARN guide porte la construction MS2 qui permet la fixation du complexe MCP-effecteur2 (adli, 2018).

La dernière approche d'activation de l'expression d'un gène consiste en l'approche SunTag. Elle consiste en l'échafaudage d'un réseau de peptides répétitifs, fusionnés à la dCas9, qui vont être utilisés pour recruter plusieurs copies d'un anticorps. Ces derniers vont être reconnus et fixés par un effecteur choisi (Adli, 2018).

Les trois stratégies qui cumulent plusieurs activateurs transcriptionnels, ont montré une efficacité supérieure dans l'expression du gène ciblé par rapport à celle qui n'en utilisait qu'un (Adli, 2018).

### *Modification de l'épigénome*

Des stratégies utilisant le système CRISPR/Cas 9 permettent également d'agir sur les marques épigénétiques. Les marques épigénétiques sont des modifications chimiques des bases de l'ADN ou des histones qui n'altèrent pas le code génétique mais qui agissent sur l'expression des gènes. Elles se caractérisent par une méthylation de l'ADN ou une acétylation/ méthylation des histones par exemple.



### **Modification de la méthylation**

La méthylation de l'ADN est une des plus anciennes modifications identifiées comme mécanisme épigénétique (Adli, 2018). Il a été établi, chez les plantes, que la méthylation se faisait sur trois types de séquences : CG, CHG ou CHH (H = A, T ou C). Les DNMT3A et DNMT3B sont deux enzymes ADN méthyltransférase (DNA Methyltransferase enzyme) qui catalysent la méthylation *de novo* de l'ADN. Les protéines TET1, TET2 et TET3 (ten-eleven translocation proteins (TNT)), sont quant à elles, impliquées dans les mécanismes de déméthylation de l'ADN.

La déméthylation de l'ADN d'une région utilisée en tant que plateforme recruteuse et fusionnée au domaine catalytique des TET1 a pu être réalisée grâce à l'action d'une dCas9. Il a alors été observé une augmentation de l'expression de l'ARNm (ARN messenger) à cette localisation (Adli, 2018 ; Chen *et al.*, 2019)

La fusion d'une dCas9 avec le domaine catalytique DNMT3A a également été testée, ce qui a permis d'observer la formation de méthylations dans la séquence ciblée, ainsi qu'une altération de l'expression des gènes (Adli, 2018). Malheureusement, de nombreux effets hors cibles ont été constatés.

### **Modification des histones**

Une autre voie d'étude de l'épigénome sont les histones. Pour rappel, dans le noyau des cellules, le génome est sous forme de chromosomes, composés d'une forme compactée et organisée de l'ADN, que l'on nomme chromatine. La chromatine peut se trouver à la fois sous forme condensée ou sous forme décondensée. La chromatine condensée se nomme « hétérochromatine » et son état décondensé se nomme « euchromatine » (Liu *et al.*, 2020). Lorsque l'on déroule cette chromatine, une structure en forme de collier de perles se dessine, dont chaque « perle », nommée nucléosome, se compose d'un octamère d'histones : H2A, H2B, H3 et H4, sur lequel s'enroule l'ADN.

La condensation et la décondensation de la chromatine sont principalement contrôlées par l'acétylation et la désacétylation des histones, régulées par deux principales enzymes, l'histone acétyltransférase (HAT) et l'histone désacétylase (HDAC). L'acétylation des histones va modifier la charge électrique de la protéine et donc de l'octamère, la rendant moins positive, ce qui va provoquer une diminution de l'attraction de l'ADN qui lui est chargé négativement (Somi et Bong-Kiun, 2017). Cette modification se caractérise par un relâchement de l'enroulement de l'ADN autour des histones. Ainsi, plus les histones sont acétylés, plus la chromatine se décondense et inversement. L'euchromatine, par sa forme décondensée, permet l'accession de l'ADN aux processus transcriptionnels (Liu B. *et al.*, 2020). La méthylation des histones, réalisée par les histones méthyltransférases (HMT), permet donc la répression ou l'activation de la transcription des gènes.

Diverses stratégies jouant sur la méthylation/déméthylation ou sur l'acétylation/désacétylation ont été développées. Parmi elles, 1) la fusion de l'enzyme Histones Déméthylase (LSD) à la dCas9, a permis d'éliminer la marque H3K4<sup>me</sup>, c'est-à-dire la méthylation d'une lysine sur l'histone 3, provoquant la réduction locale de l'expression des gènes ciblés (Kearns *et al.*, 2015). 2) la fusion d'une dCas9 avec une méthyltransférase (HMT), qui permet la méthylation précise d'une marque localisée sur la lysine 4 de l'histone 3, a permis la ré-expression d'un gène silencieux (Cano-Rodriguez *et al.*, 2016). 3) Le recrutement et la fusion de l'histone acétyltransférase (HAT), avec une dCas9, a permis une augmentation locale des acétylations des histones (Hilton *et al.*, 2015). Enfin, 4) la fusion d'une HDAC avec une dCas9 a permis la réduction de l'expression d'un gène (Kwon *et al.*, 2017).

L'un des défis futurs est de relier chaque marque épigénétique avec les régulations associées. Le complexe dCas9 associé à des modificateurs épigénétiques permet aujourd'hui d'être un outil dans la compréhension des phénomènes épigénétiques et donc de la régulation du génome.

## 2.1.5. Modifications Multiplexes

Le principe de l'édition multiplexée consiste à produire et exprimer simultanément différents ARNs guides, dans les cellules de la plante hôte, avec la protéine Cas9 (pour plus de détails se référer à la saisine de 2016).

L'édition multiplexe du génome peut être utilisée dans la régulation des gènes, l'accumulation des traits et le contrôle des voies de régulation, ce qui peut potentiellement faciliter l'amélioration, la sélection et la domestication des cultures agricoles (Zhu *et al.*, 2020). Plusieurs approches techniques différentes de multiplexage ont été développées, elles sont actuellement utilisées ou sont en cours de développement pour la production simultanée et efficace de plusieurs ARN guides (Montecillo *et al.*, 2020).

### ❖ Plusieurs ARNs guides avec leur propre cassette d'expression

Cette méthode d'expression multiplexe, par les ARN guides, se compose d'une construction de plusieurs ARN guides possédant chacun leur propre Cassette d'expression. Ils peuvent être placés dans un ou plusieurs plasmides. Dans les deux cas, chaque ARN guide possède ses propres promoteur et terminateur (Hsieh-feng et Yang, 2019 ; McCarty *et al.* ; 2020).

Cette méthode pose de nombreux problèmes, par exemple, l'utilisation de multiples promoteurs Pol III a pour effet de créer une « interférence » avec le promoteur endogène, créant une réduction dans l'activité transcriptionnelle du gène. L'utilisation de plusieurs plasmides s'avère peu efficace et cytotoxique (Hsieh-Feng et Yang, 2019).

### ❖ ARNs guides synthétiques traités par le processus natif du CRISPR de type II

La nucléase Cpf1, aussi connue sous le nom de Cas12a, est une protéine analogue de la Cas 9, qui ne nécessite pas la présence de tracrRNA, elle est de plus petite taille et est capable de traiter les crRNA sans addition de nucléases. Cpf1 reconnaît et coupe les sites riches en motifs AT (Hsieh-Feng et Yang, 2019). Le principe consiste à introduire un grand nombre de crRNA séparés par des séquences répétées riches en AT, qui vont former des petites épingles à cheveux. La nucléase Cpf1 va ainsi couper ces sites, lors de la transcription, et libérer des crRNA matures dans la cellule ((Hsieh-Feng et Yang, 2019 ; McCarty *et al.*, 2020).

### ❖ Plusieurs ARNs guides dans un transcrit polycistronique primaire

#### Choix du promoteur et de la structure de la Cassette d'expression

Les différentes stratégies du multiplexage développées ci-dessous, peuvent utiliser une Cassette transcriptionnelle ou deux. La première, le TCTU (Two-component transcriptional unit) « deux unités transcriptionnelles différentes » consiste à utiliser une cassette d'expression pour la protéine Cas 9 et une cassette d'expression pour le sgRNA polycistronique. Le STU (= single transcriptional unit), « une seule unité transcriptionnelle », utilise quant à elle, une même cassette d'expression pour la Cas9 et les sgRNA. Cette stratégie permet de réduire la taille de la construction. Enfin, des promoteurs bidirectionnels (Bidirectional promoters ou BiP) ont récemment été utilisés pour conduire l'expression de la Cas9 et de l'ARNg dans des directions différentes chez la levure et le riz. Elle est pourvue d'un promoteur bidirectionnel et de deux terminateurs distincts. Des études ont montré une meilleure performance du système STU pour le multiplexage que le système TCTU (Hsieh-Feng et Yang, 2019 ; Montecillo *et al.*, 2020).

### 1/ L'endoribonucléase Csy4

L'endoribonucléase Csy4 a été caractérisée chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, (Montecillo *et al*, 2020). Le système CRISPR de type I est composé d'un opéron de Cas et de CRISPR RNA (crRNA) en série, séparés par des séquences de reconnaissance de l'endoribonucléase, Csy4. Cette dernière est responsable de la génération du crRNA (CRISPR RNA) mature par la découpe en 3' de la boucle finale du pre-crRNA. L'activité de clivage de la Csy4 est dictée par la présence d'un fragment d'ARN de 16 nucléotides minimum présent dans les 28 nucléotides des séquences répétées codées par le locus CRISPR (Montecillo *et al*, 2020). La présence de cette séquence de reconnaissance de la Csy4 est suffisante pour son activité clivante. Sur ce principe, une construction artificielle d'ARN guides incluant la séquence de reconnaissance de l'endoribonucléase, de part et d'autre, additionnée à une co-expression de la protéine Csy4 avec la protéine Cas va ainsi permettre de libérer les ARN guides et réaliser des actions ciblées concomitantes. Le principal désavantage de ce système est qu'il requiert la transformation et l'expression d'une Csy4 exogène (Hsieh-Feng et Yang, 2019). Cette méthode a été, pour la première fois, utilisée avec succès dans des cellules humaines, et a ensuite été utilisée chez *Arabidopsis*, la tomate, le blé et l'orge notamment (Montecillo *et al*, 2020).

### 2/ Stratégie basée sur le ribozyme

Les ribozymes sont des molécules d'ARN avec une activité enzymatique. La plupart d'entre elles ont une activité nucléasique ce qui va permettre la découpe précise de l'ARN. Comme développé précédemment, une construction artificielle d'ARN guides est produite avec, de part et d'autre, l'insertion de sites de reconnaissance et de clivage des ribozymes, cette construction est dite « RGR » pour Ribozyme-gRNA-Ribozyme. Ces ribozymes ont la capacité de s'autocliner. Généralement, deux ribozymes différents sont utilisés, la ribozyme « hammerhead » (HH), qui coupe en 5' l'ARN guide, et le ribozyme du virus de l'hépatite delta (HDV), qui clive en 3' (Montecillo *et al*, 2020). Cette méthode a été pour la première fois utilisée sur des levures pour un seul ARN guide (Hsieh-Feng et Yang, 2019).

### 3/ Stratégie basée sur le processus endogène des ARNt

Cette approche nommée PTG (Polycistronic tRNA-gRNA) consiste à exploiter le processus endogène des ARNt (ARN de transfert) existant dans la cellule hôte. Pour rappel, les ARNt sont des molécules en forme de trèfle qui permettent la synthèse des protéines dans les ribosomes. Le processus naturel recrute les RNase P et Z pour la maturation des pré-ARNt en ARNt par la découpe respective de ses extrémités 5' et 3'. Ainsi, la création d'un transcrit artificiel tRNA-gRNA permet le recrutement des deux RNases endogènes, qui vont couper les extrémités de l'ARNt, permettant ainsi de libérer les ARN guides dans la cellule. Ces derniers seront ensuite couplés à la protéine Cas pour réaliser les modifications ciblées de l'ADN (Hsieh-Feng et Yang, 2019 ; Montecillo *et al*, 2020 ; McCarty *et al.*, 2020 ; Das *et al.*, 2022).

#### ❖ Clivage des ARNs guides par les nucléases endogènes

Cette méthode consiste en une construction polycistronique composée d'un assemblage d'ARN guides, séparés entre eux par une séquence de 6-12 paires de bases, et connectés en 3' au gène de la Cas9. Cette structure est sous contrôle d'un promoteur unique, reconnu par la Polymérase II. Les RNases endogènes (RNase III et RNase T1), permettent ainsi la formation d'ARN guides fonctionnels provenant du transcrit primaire Cas9-gRNA (Hsieh-Feng et Yang, 2019 ; Montecillo *et al*, 2020).

#### ❖ Introduction des ARNs guides dans les introns ou les ORF

Cette méthode consiste à introduire, dans un intron, un assemblage polycistronique d'ARNt-ARNg (PTG). L'intron va être placé en 5' du gène *Cas9*. Ces différents éléments vont être sous le contrôle du même promoteur. La construction des ARN guides dans l'intron,

reprend la stratégie évoquée précédemment, basée sur l'utilisation des ARNt. Ainsi, lors du processus d'épissage, les introns éliminés vont former des structures en lasso, qui vont être coupés en 5' et 3' par les RNAses P et Z. Les ARN guides vont être libérés et s'associer à la protéine Cas9. Sur le même principe, une autre étude montre qu'il est possible également d'introduire le montage « intron-ARN guides » dans l'ORF du gène *Cas9* (Ding *et al.*, 2018 ; Zhong, *et al.*, 2020 ; Montecillo *et al.*, 2020).

## 2.1.6. Le réarrangement chromosomique

Avec l'apparition de méthodes d'édition plus précises et robustes, des approches plus ambitieuses ont vu le jour avec le souhait de manipuler la recombinaison méiotique ou la réorganisation à grande échelle des chromosomes (Das *et al.*, 2022). La réorganisation des chromosomes a pu être induite grâce à l'utilisation du système CRISPR/Cas. En effet, quand deux coupures DSB sont réalisées sur le même chromosome, au même moment, cela provoque une délétion ou une inversion. Si le DSB se fait sur deux chromosomes distincts, cela peut causer potentiellement une translocation (Das *et al.*, 2022). Une translocation est un transfert d'une partie d'un chromosome à un autre chromosome. translocation s'effectue lors de la méiose entre deux chromosomes homologues (et/ou homéologues) par le processus de Crossing Over (CO). La variabilité de l'information génétique dans chaque organisme peut être dues aux mutations naturelles conduisant à l'altération d'une ou plusieurs bases de l'ADN, mais elle peut être également issue des modifications de la structure des chromosomes, comme cela a pu être observé à plusieurs reprises au cours de l'évolution de différentes espèces. Il a été démontré, pour les plantes, que des *loci* de caractères quantitatifs (QTL) peuvent être situés dans des régions inversées, ce qui peut rendre difficile le transfert des gènes par croisement. Surtout s'il est observé une absence de CO dans la région chromosomique inversée, comme cela a été observé chez *Arabidopsis* (Schmidt *et al.*, 2020).

### **Inversion de gènes sur un chromosome**

Récemment, l'inversion du gène *hk4S* a été réalisée chez l'écotype Col-0 d'*Arabidopsis*. Cet écotype présente naturellement une inversion datant de 5000 ans sur le chromosome 4, caractérisée par la présence d'une partie du centromère au milieu du bras court. En utilisant de façon synchronisée deux systèmes CRISPR/SauCas9 (*Staphylococcus aureus* Cas9 : PAM= NNGRRT (R= A ou G) (Collias et Beisel, 2021)) dont les séquences cibles se trouvent dans des régions intergéniques entourant l'inversion, l'équipe de Schmidt *et al.* (2020) a réussi à ré-inverser cette séquence centromérique, afin qu'elle se retrouve à sa position historique. Ils ont observé une transmission de l'inversion aux générations T1 et T2 avec une efficacité encore très relative. Le retour à l'état « sauvage » de cette région chromosomique chez Col-0 a permis le rétablissement des crossing-overs dans cette région, qui étaient alors éteints par l'inversion historique (Schmidt *et al.*, 2020 ; Das *et al.*, 2022).

### **Translocation d'une zone chromosomique**

Une recherche menée en 2020, par Beying *et al.*, a permis la translocation réciproque et « sur mesure » d'une partie du chromosome 1 avec le chromosome 2, ainsi que du chromosome 1 avec le chromosome 5 chez *Arabidopsis* (Das *et al.*, 2022). Sur le même principe, le système CRISPR/SaCas9 est utilisé pour réaliser des cassures localisées sur deux chromosomes hétérologues. La restructuration contrôlée des génomes végétaux doit encore être testée sur des plantes d'intérêt commercial, mais au vu des résultats obtenus, ces restructurations chromosomiques peuvent restaurer la recombinaison de portions du génome (Beying *et al.*, 2020 ; Schmidt *et al.*, 2020), mais également la bloquer et posent des questions sur la compatibilité de ces méthodes avec la sélection conventionnelle.

## 2.1.7. Obtention de plantes éditées sans phase intermédiaire de transgénèse

CRISPR est un très bon outil d'analyse fonctionnelle ou de création variétale mais son utilisation est contrainte par la capacité à transformer génétiquement, avec le module CRISPR/Cas, la plante dont on veut modifier un gène. L'innovation ici est de s'affranchir de l'étape de transformation génétique par le module CRISPR pour pouvoir faire de l'édition chez des plantes récalcitrantes à la transformation. Du fait de sa facilité d'utilisation et de sa robustesse, le système a été adapté pour permettre une édition rapide du génome. Cette révolution a initié la mobilisation d'outils de délivrance du système sans insertion d'ADN exogène dans le génome de la plante éditée (Zhu *et al.*, 2020).

### ❖ Utilisation des ribonucléoprotéines (RNP)

Du fait de législations contraignantes vis-à-vis de l'insertion d'ADN exogènes dans les génomes des plantes, les scientifiques cherchent aujourd'hui à développer des méthodes permettant de s'en passer. Ils ont ainsi pu s'en abstraire, par l'utilisation du système CRISPR/Cas9 sous forme de Ribonucléoprotéine (RNP). L'association de la nucléase Cas9 (Protéine) avec le tracrRNA hybridé à la crRNA (ARNg) forme un complexe ribonucléoprotéique (Zhang S. *et al.*, 2021). Cette construction, aussi efficace qu'un système utilisant un plasmide, présente une réelle diminution des effets hors cibles dans les cellules, du fait de sa dégradation rapide. Les Cas9-ARN-guide-RNPs peuvent cliver l'ADN cible directement après son insertion en s'affranchissant de la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle dans la cellule (Laforest *et al.*, 2022). Sa dégradation rapide permet une action éphémère évitant ainsi les effets hors cibles redoutés. Plusieurs méthodes de délivrance des RPN (permettant une édition dite ADN-free) ont été développées. (Chen *et al.*, 2019 ; Adli, 2018).

### 1/ Méthode de transfection des protoplastes

Cette méthode de délivrance du système CRISPR/Cas sous forme de RNP (Ribonucléoprotéine), permet son introduction dans une cellule protoplastique (cellule dénuée de paroi cellulaire). Dans un premier temps, la préparation et l'isolement des protoplastes se font à l'aide de morceaux d'organes végétaux (généralement des feuilles) dépossédés de leur épiderme. Ils vont être mis en présence d'enzymes qui vont digérer les parois cellulaires. Une fois les protoplastes isolés, la délivrance du système CRISPR/Cas-RNP se fait soit à l'aide d'une transfection via PEG-Ca<sup>2+</sup>-transfection (Polyéthylène-glycol – calcium) ou par électrotransfection. Les protoplastes transfectés sont ensuite mis en culture pour régénération, développant ainsi des cals puis des plantules. L'avantage de cette technique est qu'en passant directement par la transformation d'un protoplaste, toutes les cellules régénérées posséderont le génome modifié (Yue *et al.*, 2021 ; Chen *et al.*, 2019 ; Laforest et Nadakuduti, 2022). L'inconvénient principal de cette méthode est la difficulté de régénérer des plantes fertiles à partir de protoplastes, évènement qui demeure très inefficace et/ou limité à des génotypes spécifiques. Actuellement, la régénération des plantes à partir de protoplastes a été démontrée sur plusieurs espèces, principalement des dicotylédones, dont *Arabidopsis*, le tabac, le pétunia et la vigne. Ces restrictions actuelles rendent peu pratique le déploiement d'un système de protoplastes en tant qu'approche générale pour l'édition du génome (Svitashev *et al.*, 2016).

### 2/ Méthode de bombardement

Le bombardement biolistique consiste en la délivrance du matériel génétique par une action mécanique. Cette méthode peut s'appliquer sur plusieurs types de tissus, tels que des embryons immatures, des disques de feuilles/tiges ou des cals. Le principe s'appuie sur un bombardement à haute vitesse, par des particules d'or ou de tungstène enduites de biomolécules (Laforest et Nadakuduti, 2022). Elle permet de délivrer plusieurs types de cargos tels que des plasmides, de l'ADN simple brin, de l'ARN et des ribonucléoprotéines (RNPs). De nombreuses espèces, telles que le riz, le maïs, le blé et des *Brassica*, ont été éditées par le

bombardement de particules d'or de 0.6µm enduites du complexe CRISPR/Cas-RNP. L'obtention de plantes mutées est générée, en amont, par le bombardement de cals embryogènes (Zheng G. *et al.*, 2021).

### 3/ Utilisation de zygotes

L'utilisation de zygotes permet d'éviter l'utilisation des protoplastes et la phase difficile de régénération qui lui est associée. De plus, un zygote récemment constitué de la fusion d'un gamète femelle avec un gamète mâle par électro-fusion présente une paroi immature qui peut être plus facilement pénétrée par le système CRISPR/Cas9-RNP, par transfection médiée par le PEG (Polyéthylène-glycol). La mise en culture du zygote permet l'obtention de plantes régénérées portant la mutation induite, avec une relative efficacité (14-64% chez le riz) (Toda *et al.*, 2019 ; Zheng G. *et al.*, 2021). Mis à part le riz, cette méthode a été très peu réalisée sur d'autres espèces.

## 2.1.8. Méthodes de délivrance du système CRISPR/Cas dans les plantes sans culture *in vitro*

La culture de tissus *in vitro* est un élément majeur dans le processus de la transgénèse et de l'édition du génome. Cette étape est chronophage et est difficilement applicable à toutes les variétés ou espèces. L'utilisation de réactifs moléculaires comme les régulateurs de développement (DR), qui permettent l'induction d'un programme de développement spécifique, est une voie prometteuse pour s'affranchir de la méthode de culture cellulaire (Maher *et al.*, 2020).

### ❖ Induction *de novo* du méristème



**Figure 6 Méthode d'induction de novo du méristème (D'après Maher *et al.*, 2020).** Pour créer des pousses qui transmettent des modifications génétiques à la génération suivante, les plantes sont cultivées jusqu'à ce que les méristèmes apical et axillaire soient clairement différenciés (1). Les méristèmes sont enlevés (2), et les régulateurs morphogénétiques et les réactifs d'édition de gènes sont délivrés par *A. tumefaciens* (3). Au fil du temps, des pousses modifiées par des gènes *de novo* se forment (4) et les événements d'édition sont transmis à la génération suivante (5,6).

Le principe de cette technique est l'utilisation d'une plante génétiquement modifiée, lui conférant la capacité d'exprimer une Cas9. En parallèle, des cultures d'*Agrobacterium tumefaciens* portant des gènes de régulateurs morphogénétiques et une cassette exprimant l'ARN guides sont préparées et injectées sur la zone de la tige de la plante support que l'on aura coupé (Zhu *et al.* 2020). Les régulateurs morphogénétiques vont ainsi stimuler l'embryogénèse et permettre la formation de méristèmes néoformés qui seront également mutés sur le gène cible. Ces méristèmes peuvent ensuite être séparés de la plante support et donner des plantules porteuses du génome édité après transfert sur un substrat. L'étude mettant en lumière l'intérêt de cette nouvelle technique pour fixer des mutations induites, en constatant que parmi les plantules éditées, un certain nombre ne possédaient pas de transgène, ce qui permet d'éviter l'étape de séparation du transgène dans les générations suivantes. Ainsi, les plantules permettront, dans les prochaines étapes, la formation de fleurs et de graines porteuses des modifications ciblées (Maher *et al.* 2020). Cette nouvelle méthode de délivrance, développée chez le tabac, a également été testée sur des espèces dites

« d'intérêt commercial », notamment la pomme de terre, la tomate et la vigne, avec la formation de plantules modifiées, rendant ainsi cette méthode viable et adaptable pour différentes espèces. Si elle fait ses preuves (la perte du transgène pouvant témoigner d'instabilités chromosomiques), elle promet une accélération dans la production de nouvelles plantes éditées (Maher *et al.* 2020).

❖ Virus-induced heritable gene editing

Sur le même principe que la méthode d'induction *de novo* des méristèmes, cette technique nécessite, au préalable, la modification génétique de la plante support, surexprimant la Cas 9. L'ARN guide, lui, est apporté par un système d'expression virale qui doit permettre aux ARN guides d'atteindre les cellules méristématiques. Pour cela, des ARN guides sont fusionnés avec des ARN mobiles et introduits dans l'ARN2 du virus TRV du tabac (Tobacco rattle virus). Avec l'assistance d'un *Agrobacterium*, l'infiltration se fait dans les tissus somatiques de la plante. Les éléments mobiles, optimisant le transport des ARN guides jusqu'aux cellules germinales, permettant ainsi la transmission des mutations créées à la génération suivante. Cette méthode compte une haute efficacité de transmission de la mutation à la descendance (Zhu *et al.*, 2020 ; Laforest *et al.*, 2022). Il y a ensuite production de graines porteuses du génome édité puis mise en germination. L'utilisation d'un virus à ARN à simple brin à polarité négative (SYNV : Sonchus Yellow Net Rhabdovirus) permet de délivrer un cargo plus grand ce qui permet de se passer d'une plante génétiquement modifiée pour exprimer le gène Cas9 (Laforest et Nadakuduti, 2022). Cependant cette dernière stratégie nécessite une étape supplémentaire de culture *in vitro*.

## Annexe 3 : Tableaux récapitulatifs des traits travaillés par la méthode CRISPR/Cas (d'après le site EU.Sage)

### 1. Rendement

| Trait sur le rendement  | Espèce            | Méthode                       | Référence                              |
|---|-------------------|-------------------------------|--|
| Angle des feuilles  | Peuplier          | SDN1 - CRISPR/Cas             | ( Fladung <i>et al.</i> , 2021)        |
|   | Sorgho            | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Brant <i>et al.</i> , 2022)           |
| Architecture de la plante   | Colza             | SDN1 - CRISPR/Cas             | ( Stanic <i>et al.</i> , 2021)         |
|   |                   |                               | (Zheng <i>et al.</i> , 2020)           |
|   |                   |                               | (Fan <i>et al.</i> , 2021)             |
|   | Soja              | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Bao <i>et al.</i> , 2019)             |
|   |                   |                               | (Mu <i>et al.</i> , 2022)              |
|   |                   |                               | (Zhang Z. (A) <i>et al.</i> , 2022)    |
|   | Tabac             | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Gao <i>et al.</i> , 2018)             |
|   | Tomate            | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Yang Q. (A) <i>et al.</i> , 2020)     |
|   | Orge              | SDN1 - CRISPR/Cas             | (De Souza Moraes <i>et al.</i> , 2022) |
|   | Riz               | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Butt <i>et al.</i> , 2018)            |
| (Cui <i>et al.</i> , 2020)  |                   |                               |  |
| Blé   | SDN1 - CRISPR/Cas | (Liu H. <i>et al.</i> , 2020) |  |
| Architecture de la plante - rendement   | Tomate            | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Hu G. <i>et al.</i> , 2022)           |
| Architecture du système racinaire   | Orge-blé          | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Kirschner <i>et al.</i> , 2021)       |
|   | Riz               | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Mao <i>et al.</i> , 2019)             |
|   | Coton             | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Wang Y. (B) <i>et al.</i> , 2017)     |
|   | Soja              | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Bai <i>et al.</i> , 2019)             |
| Assimilation azote  | Riz               | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Li J. <i>et al.</i> , 2018)           |
|   | Orge              | SDN1 - CRISPR/Cas             | ( Karunarathne <i>et al.</i> , 2022)   |
|   | Riz-blé           | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Zhang J. <i>et al.</i> , 2021)        |
| Biomasse  | Millet            | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Liu <i>et al.</i> , 2017)             |
| Croissance  | Fraise            | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Zhou <i>et al.</i> , 2018)            |
|   | Kiwi              | SDN1 - CRISPR/Cas             | ( Varkonyi-Gasic <i>et al.</i> , 2022) |
|   | Tomate            | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Xing <i>et al.</i> , 2022)            |
| (Kwon <i>et al.</i> , 2020)   |                   |                               |  |
| Morphologie grain/fruit   | Concombre         | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Liu X. (B) <i>et al.</i> , 2022)      |
|   | Riz               | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Zhao <i>et al.</i> , 2018)            |
| Phénotype semi-nain   | Riz               | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Han <i>et al.</i> , 2019)             |
|   | Riz maïs          | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Zhang J. <i>et al.</i> , 2020)        |
|   | Banane            | SDN1 - CRISPR/Cas             | ( Shao <i>et al.</i> , 2020)           |
| Phénotype semi-nain –<br>Tolérance à de faibles niveaux de phosphore –<br>Résistance maladies et insectes | Riz               | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Hu <i>et al.</i> , 2019)              |
| Phénotype nain  | Riz               | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Yang <i>et al.</i> , 2017)            |
|   | Tomate            | SDN1 - CRISPR/Cas             | (Tomlinson <i>et al.</i> , 2019)       |
|   |                   |                               | (Sun <i>et al.</i> , 2020)             |



|   |                            |                              |                                       |
|---|----------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| Phénotype nain - Régulation dormance des grains                                       | Orge chou                  | SDN1 - CRISPR/Cas            | ( Lawrenson <i>et al.</i> , 2015)     |
| Phénotype nain - Résistance fongique - Augmentation de la teneur en acide salicylique | Riz                        | SDN1 - CRISPR/Cas            | (Ma <i>et al.</i> , 2018)             |
| Qualité du grain  | Riz                        | SDN1 - CRISPR/Cas            | (He <i>et al.</i> , 2022)             |
| Régulation de l'évitement de l'ombre  | Soja                       | SDN1 - CRISPR/Cas            | ( Lyu <i>et al.</i> , 2020)           |
| Domestication <i>de novo</i> (lignée sauvage avec traits agronomiques d'intérêt)      | Tomate                     | SDN1 - CRISPR/Cas            | ( Zsögön <i>et al.</i> , 2018)        |
| Dormance des graines  | Riz                        | SDN1 - CRISPR/Cas            | (Jung <i>et al.</i> , 2019)           |
| Contrôle de la floraison  | Colza                      | SDN1 - CRISPR/Cas            | (Jiang <i>et al.</i> , 2018)          |
|   | Maïs                       | SDN1 - CRISPR/Cas            | (Li Q. <i>et al.</i> , 2020)          |
|   |                            |                              | (Huang C. <i>et al.</i> , 2018)       |
|   | Tomate                     | SDN1 - CRISPR/Cas            | ( Soyk <i>et al.</i> , 2016)          |
|   | Riz                        | SDN1 - CRISPR/Cas            | (Wang <i>et al.</i> , 2020)           |
| Soja  | SDN1 - CRISPR/Cas          | (Cai <i>et al.</i> , 2017)   |                                       |
|   |                            | (Li Z. <i>et al.</i> , 2020) |                                       |
| Maturation des fruits   | Tomate                     | SDN1 - CRISPR/Cas            | (Ito <i>et al.</i> , 2015)            |
| Nombre de graines   | Moutarde brune             | SDN1 - CRISPR/Cas            | (Wang G. <i>et al.</i> , 2021)        |
|   | Maïs                       | SDN1 - CRISPR/Cas            | (Guan <i>et al.</i> , 2022)           |
|   | Riz                        | SDN1 - CRISPR/Cas            | (Shen <i>et al.</i> , 2016)           |
|   |                            |                              | (Qian <i>et al.</i> , 2017)           |
|   |                            |                              | (Yuan <i>et al.</i> , 2017)           |
|   |                            |                              | (Lu K. <i>et al.</i> , 2018)          |
|   |                            |                              | (Song <i>et al.</i> , 2022)           |
|   | (Gho <i>et al.</i> , 2022) |                              |                                       |
| Soja  | SDN1 - CRISPR/Cas          | (Cai <i>et al.</i> , 2021)   |                                       |
| Nombre de grains - poids des grains   | Colza                      | SDN1 - CRISPR/Cas            | (Yang Y. <i>et al.</i> , 2018)        |
|   | Maïs                       | SDN1 - CRISPR/Cas            | ( Kelliher <i>et al.</i> , 2019)      |
| Taille des fruits - architecture des plantes  | Tomate                     | SDN1 - CRISPR/Cas            | (Rodriguez-Leal <i>et al.</i> , 2017) |
|   | Tomate                     | SDN1 - CRISPR/Cas            | ( Swinnen <i>et al.</i> , 2022)       |
| Taille du grain   | Blé                        | SDN1 - CRISPR/Cas            | (Ma <i>et al.</i> , 2015)             |
|   | Riz                        | SDN1 - CRISPR/Cas            | (Usman <i>et al.</i> , 2020)          |
|   |                            |                              | (Wang W. <i>et al.</i> , 2022)        |
| (Sheng <i>et al.</i> , 2022)  |                            |                              |                                       |
| Taille du grain - poids du grain  | Riz                        | SDN1 - CRISPR/Cas            | (Wu <i>et al.</i> , 2022)             |
|   |                            |                              | (Wu <i>et al.</i> , 2022)             |
|   |                            |                              | (Guo <i>et al.</i> , 2021)            |
|   | Blé                        | SDN1 - CRISPR/Cas            | (Hu <i>et al.</i> , 2018)             |
|   |                            |                              | (Zhang Y. <i>et al.</i> , 2018)       |
| (Guo <i>et al.</i> , 2021)  |                            |                              |                                       |
| Poids du grain - nombre de grains   | Riz                        | SDN1 - CRISPR/Cas            | (Xu <i>et al.</i> , 2016)             |
|   |                            |                              | (Li M. <i>et al.</i> , 2016)          |
| Rendement   | Soja                       | SDN1 - CRISPR/Cas            | (Ji <i>et al.</i> , 2022)             |
|   | Maïs                       | SDN1 - CRISPR/Cas            | (Liu <i>et al.</i> , 2021)            |

|   |           |                   |  |
|---|-----------|-------------------|--|
|   |           |                   | (Gao H. <i>et al.</i> , 2020)              |
|   |           |                   | (Wang Y. <b>(A)</b> <i>et al.</i> , 2017)  |
|   | Riz       | SDN1 - CRISPR/Cas | (Miao <i>et al.</i> , 2020)                |
|   |           |                   | (Zhou <i>et al.</i> , 2019)                |
|   |           |                   | (Miao <i>et al.</i> , 2018)                |
|   |           |                   | (Huang L. <i>et al.</i> , 2018)            |
|   | Tomate    | SDN1 - CRISPR/Cas | (Yuste-Lisbona <i>et al.</i> , 2020)       |
|   | Blé       | SDN1 - CRISPR/Cas | (Chen <i>et al.</i> , 2022)                |
| Rendement - retardement floraison                             | Laitue    | SDN1 - CRISPR/Cas | (Choi S.H. <i>et al.</i> , 2022)           |
| Rendement - Photosynthèse améliorée - architecture végétale - | Laitue    | SDN1 - CRISPR/Cas | (An <i>et al.</i> , 2022)                  |
| Rendement - parfum  | Riz       | SDN1 - CRISPR/Cas | (Usman <i>et al.</i> , 2020)               |
| Rendement - tolérance à la sécheresse et au stress osmotique. | Soja      | SDN1 - CRISPR/Cas | (Chen L. <i>et al.</i> , 2020)             |
| Rendement en situation de stress                              | Riz       | SDN1 - CRISPR/Cas | (Wang C. <i>et al.</i> , 2020)             |
|   | Maïs      | SDN1 - CRISPR/Cas | (Shi <i>et al.</i> , 2017)                 |
|   | Laitue    | SDN1 - CRISPR/Cas | (Bertier <i>et al.</i> , 2018)             |
| Rendement - Amélioration de la photosynthèse                  | Soja      | SDN1 - CRISPR/Cas | (Hu D. <i>et al.</i> , 2022)               |
| Reproduction  | Riz       | SDN1 - CRISPR/Cas | (Liu <i>et al.</i> , 2017)                 |
| Résistance à la verse   | Le teff   | SDN1 - CRISPR/Cas | (Beyene <i>et al.</i> , 2022)              |
|   | Riz-maïs  | SDN1 - CRISPR/Cas | (Zhang Z. <i>et al.</i> , 2020)            |
| Résistance à l'éclatement                                     | Colza     | SDN1 - CRISPR/Cas | (Braatz <i>et al.</i> , 2017)              |
|   | Riz       | SDN1 - CRISPR/Cas | (Sheng <i>et al.</i> , 2020)               |
|   | Soja      | SDN1 - CRISPR/Cas | (Zhang Z. <b>(B)</b> <i>et al.</i> , 2022) |
| Stérilité mâle  | Concombre | SDN1 - CRISPR/Cas | (Hu <i>et al.</i> , 2017)                  |
|   | Riz       | SDN1 - CRISPR/Cas | (Lee <i>et al.</i> , 2016)                 |
|   |           |                   | (Li Q. <i>et al.</i> , 2016)               |
|   |           |                   | (Xie <i>et al.</i> , 2017)                 |
| Transport du phloème  | Tomate    | SDN1 - CRISPR/Cas | (Nam <i>et al.</i> , 2022)                 |

## 2. Qualité /Nutrition

| Trait                                       | Espèce      | Méthode           | Référence                                  |
|---|-------------|-------------------|--|
| Amélioration : de la couche d'aleurone      | Riz         | SDN1 - CRISPR/Cas | (Achary <i>et al.</i> , 2021)              |
| Augmentation : teneur en glucoraphanine(GR) | Brocoli     | SDN1 - CRISPR/Cas | (Kim C.Y. <b>(B)</b> <i>et al.</i> , 2022) |
| Amélioration : arôme                        | Riz         | SDN1 - CRISPR/Cas | (Tang <i>et al.</i> , 2021)                |
|   |             |                   | (Ashokkumar <i>et al.</i> , 2020)          |
|   |             |                   | (Shao <i>et al.</i> , 2017)                |
|   |             |                   | (Hui <i>et al.</i> , 2021)                 |
|   | Soja        | SDN1 - CRISPR/Cas | (Qian <i>et al.</i> , 2022)                |
| Amélioration : Odeur aromatique             | Sorgho      | SDN1 - CRISPR/Cas | (Zhang D. <i>et al.</i> , 2022)            |
| Augmentation : acide phénolique             | Sauge rouge | SDN1 - CRISPR/Cas | (Shi <i>et al.</i> , 2021)                 |
| Amélioration : qualité du grain             | Riz         | SDN1 - CRISPR/Cas | (Wang S. <b>(B)</b> <i>et al.</i> , 2020)  |

|  |                     |                                 |   |
|--|---------------------|---------------------------------|---|
| Amélioration : sucre de haute qualité  | Riz                 | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Honma <i>et al.</i> , 2020)              |
| Augmentation : teneur en sucre soluble   | Tomate              | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Wang <i>et al.</i> , 2021)               |
| Augmentation : teneur en sucre   | Tomate              | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Kawaguchi <i>et al.</i> , 2021)          |
|  | Patate douce        | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Wang B. <i>et al.</i> , 2021)            |
| Augmentation : teneur en anthocyanes   | Raisin              | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Tu <i>et al.</i> , 2022)                 |
| Augmentation : teneur en caroténoïdes  | Riz                 | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Endo <i>et al.</i> , 2019)               |
|  |                     | SDN3 - CRISPR/Cas               | (Dong <i>et al.</i> , 2020)               |
| Amélioration : composition en acides gras  | Colza               | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Okuzaki <i>et al.</i> , 2018)            |
| Augmentation : teneur en acide oléique   | Riz                 | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Abe <i>et al.</i> , 2018)                |
|  | Cameline            | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Jiang <i>et al.</i> , 2016)              |
|  |                     |                                 | (Morineau <i>et al.</i> , 2016)           |
|  |                     |                                 | (Ozseyhan <i>et al.</i> , 2018)           |
|  | Coton               | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Chen Y. <i>et al.</i> , 2020)            |
|  | Tabouret des champs | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Jarvis <i>et al.</i> , 2021)             |
|  | Soja                | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Al Amin <i>et al.</i> , 2019)            |
| (Do <i>et al.</i> , 2019)  |                     |                                 |   |
| Colza  | SDN1 - CRISPR/Cas   | (Huang H. <i>et al.</i> , 2020) |   |
| Réduction : teneur en flavonoïdes ; Amélioration : acides gras                               | Colza               | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Xie <i>et al.</i> , 2020)                |
| Amélioration : qualité de l'amidon   | Pomme de terre      | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Andersson <i>et al.</i> , 2017)          |
| Augmentation : teneur en amylose   | Riz                 | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Huang L. <i>et al.</i> , 2020)           |
|  |                     |                                 | (Sun <i>et al.</i> , 2017)                |
|  |                     |                                 | (Zeng D. <i>et al.</i> , 2020)            |
|  |                     |                                 | (Baysal <i>et al.</i> , 2020)             |
|  |                     |                                 | (Liu X. (A) <i>et al.</i> , 2022)         |
|  | Blé                 | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Li <i>et al.</i> , 2020)                 |
| Pomme de terre   | SDN1 - CRISPR/Cas   | (Zhao X. <i>et al.</i> , 2021)  |   |
|  |                     | (Tuncel <i>et al.</i> , 2019)   |   |
| Manioc   | SDN1 - CRISPR/Cas   | (Luo <i>et al.</i> , 2021)      |   |
| Réduction : teneur en amylose  | Manioc              | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Bull <i>et al.</i> , 2018)               |
|  | Pomme de terre      | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Toinga-Villafuerte <i>et al.</i> , 2022) |
|  | Riz                 | SDN1 - CRISPR/Cas               | (He <i>et al.</i> , 2020)                 |
| (Zhang J. <i>et al.</i> , 2018)  |                     |                                 |   |
| Augmentation : teneur en beta-carotène   | Banane              | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Kaur <i>et al.</i> , 2020)               |
| Augmentation : teneur en fer (Fe) + en magnésium (Mn)  | Blé                 | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Connorton <i>et al.</i> , 2017)          |
| Augmentation : teneur en GABA (Acide X aminobutyrique)                                       | Tomate              | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Lee <i>et al.</i> , 2018)                |
|  |                     |                                 | (Nonaka <i>et al.</i> , 2017)             |
|  |                     |                                 | (Li R. <i>et al.</i> , 2018)              |
| Augmentation : teneur en lycopènes   | Tomate              | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Li X. <i>et al.</i> , 2018)              |
| Augmentation : teneur en lysophospholipides  | Riz                 | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Khan <i>et al.</i> , 2020)               |
| Augmentation : teneur en saccharose  | Pastèque            | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Ren <i>et al.</i> , 2020)                |
| Augmentation : teneur en vitamine C + tolérance au stress d'oxydation + teneur en ascorbate. | Laitue              | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Zhang H. <i>et al.</i> , 2018)           |
| Réduction : d'asparagine libre   | Blé                 | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Raffan <i>et al.</i> , 2021)             |
| Modification de la composition des grains  | Orge                | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Yang Q. (B) <i>et al.</i> , 2020)        |

|  |                   |                                  |   |
|--|-------------------|----------------------------------|---|
| Modification de la composition protéique   | Soja              | SDN1 - CRISPR/Cas                | (Li C. <i>et al.</i> , 2019)            |
| Parthénocarpie   | Tomate            | SDN1 - CRISPR/Cas                | (Klap <i>et al.</i> , 2016)             |
|  |                   |                                  | ( Ueta <i>et al.</i> , 2017)            |
| Réduction : acide phytique (PA)  | Riz               | SDN1 - CRISPR/Cas                | (Ibrahim <i>et al.</i> , 2021)          |
|  | Colza             | SDN1 - CRISPR/Cas                | (Khan <i>et al.</i> , 2019)             |
| Réduction : de l'accumulation de cadmium (Cd)  | Riz               | SDN1 - CRISPR/Cas                | ( Yang C-H. <i>et al.</i> , 2018)       |
|  |                   |                                  | ( Tang L. <i>et al.</i> , 2017)         |
|  |                   |                                  | ( Songmei <i>et al.</i> , 2019)         |
|  |                   |                                  | ( Chen <i>et al.</i> , 2022)            |
| Tomate   | SDN1 - CRISPR/Cas | (Liu C.X. <i>et al.</i> , 2022)  |   |
| Tabac  | SDN1 - CRISPR/Cas | (Jia <i>et al.</i> , 2022)       |   |
| Réduction : de l'accumulation d'arsenic  | Riz               | SDN1 - CRISPR/Cas                | ( Ye <i>et al.</i> , 2017)              |
| Réduction : de l'accumulation de césium (Cs)   | Riz               | SDN1 - CRISPR/Cas                | ( Nieves-Cordonos <i>et al.</i> , 2017) |
| Réduction : des niveaux d'oligosaccharides de la famille des raffinoses (RFO)                        | Soja              | SDN1 - CRISPR/Cas                | (Le <i>et al.</i> , 2020)               |
| Réduction : teneur en acide érucique (EA)  | Colza             | SDN1 - CRISPR/Cas                | (Liu Y. <i>et al.</i> , 2022)           |
| Réduction : teneur en acide phytique, amélioration : teneur en fer et en zinc dans les grains de blé | Blé               | SDN1 - CRISPR/Cas                | (Ibrahim <i>et al.</i> , 2021)          |
| Réduction : teneur en acides gras saturés  | Arachide          | SDN1 - CRISPR/Cas                | (Tang <i>et al.</i> , 2022)             |
|  | Soja              | SDN1 - CRISPR/Cas                | (Ma <i>et al.</i> , 2021)               |
| Réduction : teneur en cyanogènes toxiques  | Manioc            | SDN1 - CRISPR/Cas                | (Gomez <i>et al.</i> , 2021)            |
| Réduction : teneur en gluten   | Blé               | SDN1 - CRISPR/Cas                | ( Sánchez-León, <i>et al.</i> , 2017)   |
| Réduction : teneur en hordéine   | Orge              | SDN1 - CRISPR/Cas                | (Li Y. <i>et al.</i> , 2020)            |
| Réduction : teneur en Kafirines  | Sorgho            | SDN1 - CRISPR/Cas                | (Li A. <i>et al.</i> , 2018)            |
| Réduction : teneur en nicotine   | Tabac             | SDN1 - CRISPR/Cas                | (Burner <i>et al.</i> , 2022)           |
| Réduction : teneur en protéines allergènes   | Blé               | SDN1 - CRISPR/Cas                | ( Camerlengo <i>et al.</i> , 2020)      |
|  |                   |                                  | (Zheng Z. <i>et al.</i> , 2021)         |
|  |                   |                                  | ( Akiyama <i>et al.</i> , 2017)         |
| Pomme de terre   | SDN1 - CRISPR/Cas | ( Nakayasu <i>et al.</i> , 2018) |   |
|  |                   | ( Long <i>et al.</i> , 2021)     |   |
| Elimination : teneur en lipoxgénase  | Soja              | SDN1 - CRISPR/Cas                | (Wang J. <i>et al.</i> , 2020)          |
| Elimination de l'allergène principal : Bra j I   | Moutarde brune    | SDN1 - CRISPR/Cas                | ( Assou <i>et al.</i> , 2021)           |

### 3. Stress Biotique

| Trait                       | Espèce pathogène visée                        | Espèce     | Méthode           | Référence                       |
|-----------------------------|---|------------|-------------------|---------------------------------|
| Résistance : bactérienne    | <i>Pseudomonas syringae</i>                   | Tomate     | SDN1 - CRISPR/Cas | (Ortigosa <i>et al.</i> , 2019) |
|                             | <i>Erwinia amylovora</i>                      | Pomme      | SDN1 - CRISPR/Cas | ( Pompili <i>et al.</i> , 2020) |
|                             |   |            |                   | (Malnoy <i>et al.</i> , 2016)   |
|                             | <i>Xanthomonas campestris pv. musacearum,</i> | Banane     | SDN1 - CRISPR/Cas | (Tripathi <i>et al.</i> , 2021) |
|                             | <i>Xanthomonas citri</i>                      | Citrus sp. | SDN1 - CRISPR/Cas | (Jia <i>et al.</i> , 2020)      |
|                             |   |            |                   | (Jia <i>et al.</i> , 2016)      |
|                             |   |            |                   | (Long <i>et al.</i> , 2021)     |
| (Peng <i>et al.</i> , 2017) |   |            |                   |                                 |

|                                     |   |                   |   |   |
|-------------------------------------|---|-------------------|---|---|
|                                     |   |                   |   | (Zhou <i>et al.</i> , 2018)                 |
|                                     |   |                   |   | (Wei <i>et al.</i> , 2021)                  |
|                                     |   |                   |   | (Li <i>et al.</i> , 2020)                   |
|                                     |   |                   |   | (Zeng <i>et al.</i> , 2020)                 |
|                                     |   |                   |   | (Arulganesh <i>et al.</i> , 2022)           |
|                                     |   |                   |   | (Zafar <i>et al.</i> , 2020)                |
|                                     |   |                   |   | (Zhou <i>et al.</i> , 2015)                 |
| Résistance : bactérienne + fongique | <i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae (Xoo) + Magnaporthe oryzae</i>                               | Riz               | SDN1 - CRISPR/Cas                         | (Liao <i>et al.</i> , 2018)                 |
|                                     |   |                   |   | (Li S. <i>et al.</i> , 2019)                |
|                                     |   |                   |   | (Zhou <i>et al.</i> , 2021)                 |
|                                     |   |                   |   | (Kim C.Y. (A) <i>et al.</i> , 2022)         |
|                                     | <i>Pseudomonas syringae, Phytophthora spp., Xanthomonas spp.</i>                              | Tomate            | SDN1 - CRISPR/Cas                         | (De Toledo Thomazella <i>et al.</i> , 2016) |
| Résistance : fongique               | <i>Magnaporthe oryzae</i>   | Riz               | SDN1 - CRISPR/Cas                         | (Wang F. <i>et al.</i> , 2016)              |
|                                     |   |                   |   | (Nawaz <i>et al.</i> , 2020)                |
|                                     |   |                   |   | (Liao <i>et al.</i> , 2022)                 |
|                                     | <i>Erysiphe necator</i>   | Raisin            | SDN1 - CRISPR/Cas                         | (Wan <i>et al.</i> , 2020)                  |
|                                     |   |                   |   | (Malnoy <i>et al.</i> , 2016)               |
|                                     | <i>Botrytis cinerea</i>   | Raisin            | SDN1 - CRISPR/Cas                         | (Wang X. <i>et al.</i> , 2018)              |
|                                     |   | Tomate            | SDN1 - CRISPR/Cas                         | (Jeon <i>et al.</i> , 2020)                 |
|                                     | <i>Colletotrichum truncatum</i>   | Piment            | SDN1 - CRISPR/Cas                         | (Mishra <i>et al.</i> , 2021)               |
|                                     | <i>Blumeria graminis ; Fusarium graminearum</i>   | Orge              | SDN1 - CRISPR/Cas                         | (Galli <i>et al.</i> , 2022)                |
|                                     | <i>Fusarium graminearum.</i>  | Blé               | SDN1 - CRISPR/Cas                         | (Brauer <i>et al.</i> , 2020)               |
|                                     | <i>Fusarium oxysporum f.sp. niveum</i>  | Pastèque          | SDN1 - CRISPR/Cas                         | (Zhang M. <i>et al.</i> , 2020)             |
|                                     | <i>Phytophthora sojae</i>   | Soja              | SDN1 - CRISPR/Cas                         | (Yu <i>et al.</i> , 2021)                   |
|                                     | <i>Phytophthora infestans</i>   | Pomme de terre    | SDN1 - CRISPR/Cas                         | (Kieu <i>et al.</i> , 2021)                 |
|                                     |   | Tomate            | SDN1 - CRISPR/Cas                         | (Hong <i>et al.</i> , 2021)                 |
|                                     | <i>Phytophthora palmivora</i>   | Papaye            | SDN1 - CRISPR/Cas                         | (Gumtow <i>et al.</i> , 2018)               |
|                                     | <i>Phytophthora tropicalis.</i>   | Cacao             | SDN1 - CRISPR/Cas                         | (Fister <i>et al.</i> , 2018)               |
|                                     | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>   | Colza             | SDN1 - CRISPR/Cas                         | (Zhang K. <i>et al.</i> , 2022)             |
|                                     |   |                   |   | (Sun <i>et al.</i> , 2018)                  |
|                                     | <i>Ustilagoidea virens</i>  | Riz               | SDN2 - CRISPR/Cas                         | (Liang <i>et al.</i> , 2018)                |
|                                     | <i>Ustilago maydis</i>  | Maïs              | SDN1 - CRISPR/Cas                         | (Pathi <i>et al.</i> , 2020)                |
| <i>Verticillium dahliae</i>         | Coton   | SDN1 - CRISPR/Cas | (Zhang Z. <i>et al.</i> , 2018)           |   |
| <i>Verticillium longisporum</i>     | Colza   | SDN1 - CRISPR/Cas | (Pröbsting <i>et al.</i> , 2020)          |   |
| <i>Oidium neolycopersici</i>        | Blé   | SDN1 - CRISPR/Cas | (Zhang <i>et al.</i> , 2017)              |   |
|                                     | Tomate  | SDN1 - CRISPR/Cas | (Santillán Martínez <i>et al.</i> , 2020) |   |
|                                     |   |                   | (Nekrasov <i>et al.</i> , 2017)           |   |
| Résistance : virale + fongique      | Virus de l'enroulement jaune des feuilles de la tomate (TYLCV) + <i>Oidium neolycopersici</i> | Tomate            | SDN1 - CRISPR/Cas                         | (Pramanik <i>et al.</i> , 2021)             |

|                              |   |                |                   |                                       |
|------------------------------|---|----------------|-------------------|---------------------------------------|
| Résistance : virale          | Virus Y de la pomme de terre (PVY : Potato virus Y)   | Pomme de terre | SDN1 - CRISPR/Cas | (Zhan <i>et al.</i> , 2019)           |
|                              |   | Tabac          | SDN1 - CRISPR/Cas | (Noureen <i>et al.</i> , 2022)        |
|                              | Virus sphérique du riz tungro (RTSV : Rice tungro spherical virus)  | Riz            | SDN1 - CRISPR/Cas | (Ruyi <i>et al.</i> , 2021)           |
|                              |   |                |                   | (Macovei <i>et al.</i> , 2018)        |
|                              | Virus de l'enroulement des feuilles jaunes (PepYLCV : Pepper yellow leaf curl virus),   | Piment         | SDN1 - CRISPR/Cas | (Kurniawati <i>et al.</i> , 2020)     |
|                              |   | Tomate         | SDN1 - CRISPR/Cas | (Tashkandi <i>et al.</i> , 2018)      |
|                              | Virus de la marbrure du poivre (PepMoV : Pepper Mottle Virus)   | Tomate         | SDN1 - CRISPR/Cas | (Yoon <i>et al.</i> , 2020)           |
|                              | Virus de l'enroulement jaune des feuilles de la tomate (TYLCV : Tomato yellow leaf curl Virus)  | Tomate         | SDN1 - CRISPR/Cas | (Faal <i>et al.</i> , 2020)           |
|                              | tobamovirus   | Tomate         | SDN1 - CRISPR/Cas | ( Kravchik <i>et al.</i> , 2022)      |
|                              | Virus de la marbrure veineuse du poivre (PVMV : pepper veinal mottle Virus)   | Tomate         | SDN1 - CRISPR/Cas | (Kuroiwa <i>et al.</i> , 2021)        |
|                              | Virus de la betterave à tête bouclée (BSCTV : beet severe curly top Virus)  | Tabac          | SDN1 - CRISPR/Cas | (Ji <i>et al.</i> , 2015)             |
|                              | Virus de la mosaïque du concombre (CMV) ; du virus de la mosaïque du tabac (TMV)  | Tabac          | SDN1 - CRISPR/Cas | (Zhang T. <i>et al.</i> , 2018)       |
|                              | Virus de la striure brune du manioc (CBSD : Cassava brown streak virus).  | Manioc         | SDN1 - CRISPR/Cas | (Gomez <i>et al.</i> , 2019)          |
|                              | Virus nain du blé (WDV : Wheat dwarf virus)   | Orge           | SDN1 - CRISPR/Cas | (Kis <i>et al.</i> , 2019)            |
|                              | Virus nain strié de noir du riz (RBSDV)   | Riz            | SDN1 - CRISPR/Cas | (Wang W. <i>et al.</i> , 2021)        |
|                              | Virus du jaunissement des veines du concombre ; Virus de la mosaïque jaune de la courgette ; virus de la mosaïque des taches de l'anneau de la papaye   | Concombre      | SDN1 - CRISPR/Cas | (Chandrasekaran <i>et al.</i> , 2016) |
|                              | Virus de la striure de la banane (BSV : Banana streak virus)  | Banane         | SDN1 - CRISPR/Cas | (Tripathi <i>et al.</i> , 2019)       |
|                              | Virus de la cascade chlorotique de la patate douce (SPCSV : sweet potato chlorotic stunt virus) + virus de la marbrure plumeuse de la patate douce (SPFMV : sweet potato feathery mottle virus) | Patate douce   | SDN1 - CRISPR/Cas | (Yu <i>et al.</i> , 2021)             |
| Résistance : insectes        | <i>Helicoverpa armigera + Spodoptera litura</i>   | Soja           | SDN1 - CRISPR/Cas | (Zhang Y. <i>et al.</i> , 2022)       |
|                              | <i>Nilaparvata lugens ; Chilo suppressalis</i>  | Riz            | SDN1 - CRISPR/Cas | (Lu H.P. <i>et al.</i> , 2018)        |
|                              |   | Tomate         | SDN1 - CRISPR/Cas | (Sun <i>et al.</i> , 2021)            |
| Résistance : pucerons        |   | Pastèque       | SDN1 - CRISPR/Cas | (Li M. <i>et al.</i> , 2022)          |
| Résistance : plante parasite | <i>Phelipanche aegyptiaca</i>   | Tomate         | SDN1 - CRISPR/Cas | (Bari <i>et al.</i> , 2021)           |
|                              |   |                |                   | (Bari <i>et al.</i> , 2019)           |

## 4. Stress Abiotique

| Trait lié au stress abiotique     | Espèce            | Méthode                         | Référence                           |
|-----------------------------------|-------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| Tolérance : carence en potassium  | Riz               | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Mao <i>et al.</i> , 2016)          |
| Tolérance : salinité              | Riz               | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Alfatih <i>et al.</i> , 2020)      |
|                                   |                   |                                 | (Duan <i>et al.</i> , 2016)         |
|                                   |                   |                                 | (Zhang <i>et al.</i> , 2019)        |
|                                   |                   |                                 | (Lim <i>et al.</i> , 2021)          |
|                                   |                   |                                 | (Kitomi <i>et al.</i> , 2020)       |
|                                   |                   |                                 | (Xiaoli <i>et al.</i> , 2022)       |
|                                   |                   |                                 | (Shah Alam <i>et al.</i> , 2022)    |
|                                   | Soja              | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Wang T. <i>et al.</i> , 2021)      |
| Orge                              | SDN1 - CRISPR/Cas | (Vicko <i>et al.</i> , 2020)    |                                     |
| Tomate                            | SDN1 - CRISPR/Cas | (Tran <i>et al.</i> , 2021)     |                                     |
|                                   |                   | (Bouzroud <i>et al.</i> , 2020) |                                     |
| Tolérance : sécheresse + salinité | Riz               | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Yue <i>et al.</i> , 2020)          |
|                                   | Soja              | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Curtin <i>et al.</i> , 2018)       |
| Tolérance : sécheresse            | Riz               | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Ogata <i>et al.</i> , 2020)        |
|                                   |                   |                                 | (Lou <i>et al.</i> , 2017)          |
|                                   |                   |                                 | (Liao <i>et al.</i> , 2019)         |
|                                   |                   |                                 | (Bang <i>et al.</i> , 2021)         |
|                                   |                   |                                 | (Zhang Y. <i>et al.</i> , 2020)     |
|                                   | Tomate            | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Illouz-Eliaz <i>et al.</i> , 2020) |
|                                   |                   |                                 | (Liu L. <i>et al.</i> , 2021)       |
|                                   | Blé               | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Kim D <i>et al.</i> , 2018)        |
| Tabac                             | SDN1 - CRISPR/Cas | (Negin <i>et al.</i> , 2021)    |                                     |
| Pomme de terre                    | SDN1 - CRISPR/Cas | (Gonzales <i>et al.</i> , 2020) |                                     |
| Maïs                              | SDN1 - CRISPR/Cas | (Njuguna <i>et al.</i> , 2018)  |                                     |
| Tolérance : chaleur               | Tomate            | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Yu <i>et al.</i> , 2019)           |
| Tolérance : froid                 | Riz               | SDN1 - CRISPR/Cas               | (Zeng Y. <i>et al.</i> , 2020)      |

## 5. Couleur

| Trait lié à la couleur    | Espèce      | Méthode           | Référence                         |
|---------------------------|-------------|-------------------|-----------------------------------|
| Couleur : blanc crème     | Colza       | SDN1 - CRISPR/Cas | (Li H. <i>et al.</i> , 2022)      |
| Couleur : jaune et orange | Tomate      | SDN2 - CRISPR/Cas | (Dahan-Meir <i>et al.</i> , 2018) |
| Couleur : orange          | Tomate      | SDN2 - CRISPR/Cas | (Ben Shlush <i>et al.</i> , 2021) |
| Couleur : pourpre         | Carotte     | SDN1 - CRISPR/Cas | (Xu <i>et al.</i> , 2019)         |
|                           | Tomate      | SDN2 - CRISPR/Cas | (Cermak <i>et al.</i> , 2015)     |
| Couleur : rose            | Tomate      | SDN1 - CRISPR/Cas | (Deng <i>et al.</i> , 2018)       |
|                           |             |                   | (Yang <i>et al.</i> , 2019)       |
| Couleur : rose violacée   | Pétunia     | SDN1 - CRISPR/Cas | (Yu <i>et al.</i> , 2021)         |
| Couleur : rouge           | Riz         | SDN1 - CRISPR/Cas | (Zhu <i>et al.</i> , 2019)        |
| Couleur : jaune           | Ipomoea nil | SDN1 - CRISPR/Cas | (Watanabe <i>et al.</i> , 2018)   |

|                            |                |                   |   |
|----------------------------|----------------|-------------------|---|
| Modification de la couleur | Carotte        | SDN1 - CRISPR/Cas | ( Klimek-Chodacka <i>et al.</i> , 2018) |
|                            | Poinsettia     | SDN1 - CRISPR/Cas | ( Nitarska <i>et al.</i> , 2021)        |
|                            | Torenia        | SDN1 - CRISPR/Cas | ( Nishihara <i>et al.</i> , 2018)       |
| Phénotype : Albinos        | Pastèque       | SDN1 - CRISPR/Cas | (Tian <i>et al.</i> , 2016)             |
|                            | Pomme - poire  | SDN1 - CRISPR/Cas | (Charrier <i>et al.</i> , 2019)         |
|                            | Pomme de terre | SDN1 - CRISPR/Cas | ( Bánfalvi <i>et al.</i> , 2020)        |
|                            | Banane         | SDN1 - CRISPR/Cas | (Naim <i>et al.</i> , 2018)             |
|                            |                |                   | (Kaur <i>et al.</i> , 2017)             |
|                            | Coton          | SDN1 - CRISPR/Cas | (Wang P. <i>et al.</i> , 2017)          |
|                            | Fraise         | SDN1 - CRISPR/Cas | (Gao Q. <i>et al.</i> , 2020)           |
|                            |                |                   | (Wilson <i>et al.</i> , 2019)           |
|                            | Igname         | SDN1 - CRISPR/Cas | ( Syombua <i>et al.</i> , 2021)         |
|                            | Kiwi           | SDN1 - CRISPR/Cas | (Wang Z. <i>et al.</i> , 2018)          |



## Annexe 4 : Etudes de cas des services et disservices

Pour commencer ce travail de réflexion sur les nouvelles techniques d'amélioration des plantes, par la méthode CRISPR/Cas, et dans le but d'identifier les difficultés que pourraient représenter les variétés issues des NBT sur l'évaluation variétale actuellement en place, les membres du Comité Scientifique ont été invités à 1) identifier des traits qui pourraient répondre aux enjeux de la transition agroécologique et du pacte vert européen, 2) identifier des caractères nouveaux et les disservices associés qui pourraient être spécifiques aux techniques d'édition du génome. Le tour de table, et les discussions associées, ont donné lieu à l'établissement de trois études de cas, qui ont permis d'identifier les services et les disservices liés aux traits choisis. NBT Trois études de cas ont été retenues sur les neuf proposées. Il s'est avéré que le système racinaire, les composés organiques volatils biogéniques (COVB) et le cas particulier des porte-greffes constituait de bons exemples des problématiques que pourraient représenter les NBTs.

### 1. Système racinaire :

Dans la saisine « Quelles variétés pour l'agroécologie ? » réalisée par le Comité Scientifique du CTPS, en 2021, deux grands principes avaient été développés pour améliorer la nutrition des plantes par le compartiment racinaire, 1) par un travail sur l'architecture racinaire, 2) par le recrutement de macro et micro-organismes favorables. Avec le développement des techniques de mutagenèse dirigée, il serait hypothétiquement possible d'améliorer la captation et la restitution des éléments minéraux parfois peu accessibles (P, N, K, ...), ainsi que de l'eau disponible. Les attentes, en termes d'agroécologie étant la réduction des intrants, l'amélioration de la captation et de l'assimilation des éléments par la plante, il est intéressant de s'interroger sur les services et disservices que ces traits pourraient apporter lors de leur déploiement en champ, surtout s'ils nécessitent le recrutement de macro et micro-organismes.

Les interactions avec les micro et macro-organismes sont centrales dans la nutrition des plantes, le contrôle et la protection contre les bioagresseurs mais aussi dans le maintien de la biodiversité aérienne et sous-terrainne (Saisine du Comité Scientifique CTPS – Quelles variétés pour l'agroécologie ? 2021). Toutefois, toute la difficulté repose sur l'identification des traits qui permettent à la plante de valoriser ces interactions, additionné à la multiplicité des composantes qui agissent sur ces interactions. Au-delà de ces difficultés, dans l'hypothèse d'une meilleure connaissance des « acteurs génétiques » et d'une capacité d'action par mutagenèse dirigée, il faut s'interroger sur les risques que tels traits pourraient engendrer sur l'écosystème. En outre, le développement de la biomasse racinaire, par son architecture, peut rendre plus efficace sa captation de l'eau, afin d'apporter une meilleure tolérance à un stress hydrique (ex : sécheresse, ...).

Ainsi, l'étude réalisée ici, se fait dans l'hypothèse d'une modification de l'ADN par mutagenèse dirigée, dont le but est le développement de traits optimisant l'absorption racinaire afin de répondre aux enjeux agroécologiques, par 1) un travail sur l'architecture racinaire, 2) par le recrutement de macro et micro-organismes favorables

#### **Deux traits sont traités dans cette étude du compartiment racinaire :**

- 1/ Booster la sécrétion racinaire pour permettre le recrutement de microorganismes symbiotiques du sol afin d'optimiser la nutrition végétale (phosphore, nitrates, etc...).
- 2/ Augmentation de la biomasse racinaire prospectrice afin d'apporter une résistance à un stress hydrique.

### 1.1. Services attendus :

- Une sécrétion racinaire attractive dans le sol : Réduction des intrants par une optimisation des captations des éléments nutritifs du sol, par le recrutement des organismes favorables. Le but est d'améliorer la nutrition végétale par ce recrutement, afin de gagner en rendement.
- Développement de l'architecture racinaire : meilleure absorption de l'eau disponible dans le sol, permettant une meilleure résistance au stress hydrique, par le développement de caractères liés à l'architecture sur système racinaire et de son déploiement dans l'espace.

### 1.2. Les points de disservices possibles sont :

**Pour la sécrétion racinaire** (Booster la sécrétion racinaire pour recruter les microbiotes du sol, afin d'augmenter la symbiose)

#### o Disservice Ecologique/écosystémique

- Risque de déséquilibre des écosystèmes : Le recrutement de macro et micro-organismes du sol, peut-il créer un déséquilibre qui aurait une incidence sur les cultures suivantes ? La modification de la microflore du sol pourrait-elle être potentiellement non adaptée aux autres cultures de la rotation ?
- Recrutement non ciblé : Ce nouveau trait, au-delà de créer un déséquilibre, peut également favoriser le « recrutement » de macro-et micro-organismes non ciblés par la sécrétion. Cette attraction peut attirer des organismes pathogènes / pénalisants.
- Impacts secondaires : L'accumulation des microorganismes recrutés peut-elle impacter la faune et la flore alentour, de façon indirecte ?
- Appauvrissement du sol : L'optimisation de la captation des éléments du sol, par la symbiose ne risque-t-elle pas d'appauvrir les sols ? Comment gérer cet appauvrissement pour les cultures suivantes ? Le service à l'instant T peut-il créer un disservice à l'instant T+1, par la nécessité de fertiliser le sol appauvri ?

#### o Durabilité

- Pas d'apport durable au sol : La sécrétion racinaire une fois retirée ne permet pas la conservation/monopolisation des microorganismes dans le sol et ne perdure qu'en présence de la culture sécrétrice. Il y aurait donc un service rendu pour le compartiment cultivé, à l'instant T, sans que cela apporte un service pour la culture suivante.
- Compromis (entre le trait apporté et une légère perte de rendement) : Dans le but d'un recrutement d'organismes favorables, il peut être imaginé que la sécrétion se fasse par la fourniture de nutriments (par ex : Sucre) pouvant modifier l'allocation des photosynthétats et potentiellement engendrer une baisse de rendement au sein de la plante. Dans ce cas, peut-il y avoir, par l'augmentation de symbiose, une baisse de rendement, rendant le rapport apport/retrait aussi important, donc nul ? Dans l'hypothèse d'une variété éditée porteuse de ce trait, il faut supposer que si elle a été sélectionnée c'est qu'il y a un rendement suffisant. Une plante trop peu performante, ne sera simplement pas sélectionnée.

**Pour le développement de l'architecture racinaire** (racines plus longues pour une captation plus en profondeur de l'eau- prospection racinaire)

Le développement racinaire peut-il impacter / monopoliser toute l'énergie nécessaire au développement des parties aériennes et donc le rendement en grains /parties foliaires ? Est-il possible d'avoir une résistance à tous les types de stress hydriques ?

### 1.3. Faisabilité de l'évaluation lors de l'inscription variétale

#### o Evaluation du trait :

Service difficile à évaluer. Seule une mise en conditions réelles incluant une diversité de types de sols, de microorganismes présents, de composition organique, de climat, etc... Pourrait donner une relative notion des améliorations qu'apporterait ce trait.

#### o Équilibre coûts/bénéfices

Surveillance : Dans le cas où un organisme vivant est recruté, faut-il créer une surveillance ? dans ce cas, comment gérer l'équilibre coûts/bénéfices ? si l'obtenteur doit faire des contrôles longs et coûteux pour l'inscription variétale, est ce que cela ne risque pas de freiner l'innovation ? Cela ne risque-t-il pas de créer une discrimination négative pour les variétés éditées ?

## 2. Accumulation de composés secondaires / Les composés organiques volatils biogéniques (C.O.V.B.)

Dans l'hypothèse d'une modification des voies métaboliques permise par les techniques de mutagenèse dirigée, il est possible d'imaginer le développement de traits permettant l'accumulation de composés secondaires (métabolites secondaires), tels que les composés organiques volatils biogéniques. Avant d'expliquer pourquoi il serait intéressant d'y parvenir, il faut comprendre ce que sont les métabolites secondaires. Il s'agit de composés phytochimiques impliqués indirectement dans les processus vitaux de bases de la plante, contrairement aux métabolites primaires. Ils se composent d'alcaloïdes, de terpènes et de composés phénoliques. Ils ont des fonctions spécifiques en réponse à une adaptation à un environnement, tels que la protection des plantes contre les ravageurs ou les pathogènes, dans l'allélopathie (compétition plante / plante), dans les processus de symbiose plantes/microorganismes (système racinaire) ainsi que dans la couleur, l'odeur et le goût des plantes [56\*].

Ici, l'exemple choisi est le développement d'une variété permettant l'émission de composés organiques volatils biogéniques attractifs (pour les auxiliaires) ou répulsifs pour les insectes ravageurs. Cet exemple, a été évoqué dans la saisine du CS CTPS (2021) sur l'agroécologie, dans le chapitre relatif à la régulation des bioagresseurs. Il y est évoqué leur capacité à repousser les insectes, à les contrôler ou à les attirer. (Saisine du Comité Scientifique CTPS – Quelles variétés pour l'agroécologie ? 2021). L'attrait d'un tel caractère, sur une plante de grande culture, représente un atout évident dans la démarche de réduction des intrants. Toutefois, il faut aussi s'interroger sur les conséquences du déploiement d'une telle variété.

### 2.1. Les services attendus :

- Résistance induite : (ex : mécanismes de stimulation des défenses des plantes), diminution de l'utilisation des produits phytosanitaires.
- Activité répulsive : sur les insectes ravageurs.
- Activité attractive : sur les auxiliaires, pour une régulation des ravageurs. L'attraction d'insectes auxiliaires est utilisée dans la lutte biologique, comme alternative à l'utilisation d'intrants. Elle consiste en « *l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs* »[57\*].

## 2.2. Les points de disservices possibles sont :

### o Disservice Ecologique/écosystémique :

- **Attraction des auxiliaires**

- Attraction non ciblée : Cette attraction, au-delà de créer un déséquilibre écosystémique, peut également favoriser le « recrutement » de ravageurs.
- Déplacement de population : Attraction des populations au niveau parcellaire va-t-il provoquer une réduction de ce même organisme autour de la parcelle ? Les parcelles alentours, dites « conventionnelles » ou « bio », vont-elles subir cet « abandon » de poste ? Les prédateurs naturels de ces organismes seront-ils à même de « contrôler » et/ou « gérer » l'afflux de cette population ? peut-il provoquer une augmentation anormale de ces organismes ?

- **Répulsion**

- Déplacement de population : Les insectes ravageurs repoussés par ces composés pourraient se « déplacer » et aller vers les parcelles alentours. Risquent-elles de subir une surpopulation de ravageurs ?
- Répulsion des auxiliaires : Les composés organiques libérés par les plantes ne risquent-ils pas de repousser certains auxiliaires ?
- Impact indirect : Quel serait l'impact sur les chaînes alimentaires s'il y a une diminution des « ravageurs ». Cela risque-t-il de provoquer un déséquilibre des écosystèmes ?

### o Disservice qualitatif :

- -Toxicité : Les composés secondaires peuvent-ils être toxiques ? dans le Cas des C.O.V., les émanations peuvent-elles être dangereuses pour l'homme et pour les animaux ? Peut-il y avoir un impact sur les co-produits (raffineries, etc...), induits par le fractionnement ou la transformation chimique ?

## 3. Se passer de porte-greffes

Dans l'hypothèse d'une utilisation des techniques de mutagenèse dirigée dans la création variétale, le troisième choix d'étude se porte sur la création de plantes pérennes modifiées par la mutation ciblée (ex : vignes, arbres fruitiers, etc...) capables de s'implanter dans les milieux divers, sans le concours d'un porte-greffe (résistance aux maladies tellurique notamment). La technique actuelle se caractérise par le greffage, qui est une technique se basant sur l'union d'un porte greffe (plante support) avec un greffon (variété d'intérêt). Le porte-greffe est la partie basse d'un pied de plante pérenne dotée d'une résistance à un agent pathogène (ex : phylloxéra pour la vigne) et adaptée au sol destinataire. Son choix, dicté par la qualité et la composition du sol, et de la résistance souhaitée, est d'importance aux vues des diverses caractéristiques qu'il procure : la vigueur (qui définira la hauteur de la plante adulte) ; sa rapidité de mise en fruits ; sa tolérance au type de sols (acide, calcaire, sec, humide...) ; la rusticité ; sa longévité. Le greffon est, quant à lui, choisi pour la qualité variétale. Ainsi, l'utilisation des NBT pour s'affranchir des portes greffes est une des options pour créer de nouvelles variétés sans passer par la technique de greffage.

### 3.1. Les services attendus :

- Éviter les incompatibilités : dans le schéma de sélection actuel, il y a deux choix : le choix du porte greffe et le choix du greffon qui peuvent être sujets à de potentiels rejets. La création de variétés pouvant s'affranchir de porte greffe serait un moyen d'éviter les incompatibilités.

- Retour à des techniques de culture traditionnelles sans portes greffes.
- Facilitation du travail du producteur par une économie du travail de greffage
- Limitation des transferts de plants donc baisse du risque phytosanitaire.
- Meilleure compatibilité avec la réglementation de l'agriculture bio ?

### 3.2. Disservices

#### o -Disservice économique :

L'assemblage porte greffe/greffon se fait par les pépiniéristes. La création de variétés par les méthodes NBT pourrait créer une préférence en termes de choix, de la part des agriculteurs, vis-à-vis de cette nouvelle méthode. Cela pourrait provoquer un délaissement de la méthode de greffage avec une disparition de ce secteur économique.

La perte du secteur économique lié au greffage induirait inévitablement une perte de compétence sur cette méthode. Additionné à une modification génétique, serait-il possible de revenir en arrière ? en terme génétique et méthodologique ?

#### o -Disservice diversité génétique :

Actuellement, de nombreuses voix se lèvent contre l'homogénéisation génétique à laquelle font face les producteurs de fruits, due à l'utilisation d'un petit nombre de porte-greffes /greffons. L'utilisation d'une méthode NBT pourrait potentiellement accentuer cette homogénéisation génétique.

### 3.3. - Faisabilité/coût de l'évaluation de la nouvelle variété :

Actuellement, les variétés des greffons sont évaluées sur des porte-greffes dits « testeurs ». L'évaluation des nouvelles variétés issues des NBT dépendra du type de sol et des conditions de culture, engageant des coûts supplémentaires par rapport aux méthodes actuelles.

#### Surveillance du compartiment sauvage

Lors de l'étude de cas de traits développés par les NBTs, il est apparu que la surveillance du compartiment sauvage était l'une des principales préoccupations en termes de disservices attendus. En effet, que ce soit l'émission de composés organiques volatils biogéniques (C.O.V.B), la substitution du greffage par une sélection « NBT » ou le développement de métabolites secondaires sécrétés, toutes ont la vocation d'apporter une résistance à la plante, par une activité répulsive ou destructive. Cette activité, pour le compartiment sauvage, peut potentiellement causer un déséquilibre des écosystèmes, par un déplacement des ravageurs ou par sa disparition. Cela pourrait causer, pour l'un, une probable accumulation des ravageurs sur les parcelles alentours ou, pour l'autre, un déséquilibre dans la chaîne alimentaire.

Même constat pour le développement d'un trait « attractif », tel que, l'émission de composés organiques volatils (C.O.V), la sécrétion racinaire ou le développement de métabolites secondaires, peuvent également favoriser le déséquilibre écosystémique par un possible déplacement des auxiliaires et/ou symbiotes des milieux alentours en faveur du milieu attractif. Le développement de composés émis pourrait également causer un brouillage olfactif potentiellement désorientant pour les espèces volantes, impactant indirectement tous les écosystèmes proches.

La fuite du trait, autre élément de préoccupation, chez les espèces sexuellement compatibles, qui risquent d'acquérir une résistance/attraction qui peut leur être favorable ou défavorable, accentuant davantage le déséquilibre des écosystèmes et le potentiel adaptatif des ravageurs ciblés. Même interrogation sur un transfert horizontal possible.

### Surveillance du compartiment cultivé

Parmi les surveillances nécessaires, celui du compartiment cultivé est d'importance. Comme évoqué précédemment, sur les quatre cas d'études proposés, trois avaient pour vocation une résistance/défense contre leurs bioagresseurs. L'une des principales préoccupations est l'obsolescence du trait par le contournement des espèces ciblées. Cette crainte est amplifiée par la potentielle utilisation d'une même modification dans de nombreuses espèces cultivées soumises à un même bioagresseur. L'homogénéisation génétique étant reconnue unanimement comme un facteur favorisant, voir accélérateur, de l'adaptation des ravageurs. En effet, il a été observé, chez les plantes génétiquement modifiées produisant des protéines insecticides de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (Bt), des résistances se développer au bout de 2 ans, dans les régions où les zones refuges étaient trop peu nombreuses. (Abashnik et al, 2013 ; OGM : les insectes deviennent inévitablement résistants (notre-planete.info). Que faire face à un contournement rapide des espèces ravageuses ? L'accélération des cycles de création variétale ne va-t-elle pas favoriser une plasticité génétique des ravageurs ? faut-il limiter le nombre de variétés possédant ce gène ?

Pour les traits développés dans le but d'attirer les auxiliaires, comme l'émission de composés organiques volatils (C.O.V), la sécrétion racinaire ou le développement de métabolites secondaires, l'un des risques est le recrutement de macro- et micro-organismes non ciblés, comme des ravageurs ou les agents pathogènes. Cela pourrait créer une nouvelle forme de problématique sanitaire, qui n'était pas, ou peu présente alors. Enfin, l'émission de C.O.V.B. peut-elle conduire à des émanations toxiques pour l'homme et/ou des animaux ?

Une surveillance peut également être nécessaire pour la durabilité du trait. En lien avec les exemples cités ci-dessus, l'adaptation des agents pathogènes et des ravageurs aux résistances développées peuvent créer une obsolescence rapide du trait. Pour revenir à l'étude de 2013 de Abashnik *et al* sur le danger que représentait une homogénéité génétique sur l'adaptation des ravageurs, elle permet également de mettre en lumière que la durabilité efficace de défense des plantes contre les ravageurs peut être, en partie, obtenue par une gestion réfléchie des paysages agricoles. En effet, l'étude fait état du développement des résistances, dans les zones de cultures de maïs et coton Bt, sur « des lépidoptères et des coléoptères ciblés par six toxines Bt ». Ils ont observé, « comme la théorie de l'évolution le prévoit, l'apparition d'insectes résistants » à des vitesses bien différentes suivant les « paysages » aux abords des cultures. En effet, les pays, tels que l'Australie, faisant une application stricte d'un quota de zones refuges aux pourtours des champs génétiquement modifiés par ce gène, n'observent que 1% de résistance à la protéine tandis qu'aux Etats Unis, où les zones refuges sont trop peu nombreuses, la résistance s'élève à 50% (Abashnik B.E., *et al*, 2013) [19\*]. En effet, dans le cas d'un gène récessif, ce n'est pas tant la capacité des insectes à développer des résistances qui serait le problème, mais l'accentuation de la probabilité de trouver des congénères ayant développé cette même résistance et donc de produire des descendants résistants.

Cette problématique de durabilité s'entend également pour le cas de la sécrétion racinaire. En effet, le risque de lessivage des produits sécrétés pourrait rendre caducs les effets favorables espérés pour la plante cultivée ?

Enfin, la performance de la plante cultivée ne risque-t-elle pas d'être impactée par la monopolisation de son énergie à la libération de C.O.V ou de métabolites secondaires ? N'y aura-t-il des compromis entre efficacité et service agroécologique ?

### Surveillance alimentaire

Au-delà d'un simple trait apporté à une variété, sa mise sur le marché nécessite de s'interroger sur l'utilisation qui en sera fait, lors de sa commercialisation. Leur utilisation pose la question de leur dislocation/réutilisation en des produits secondaires. Dans le cadre d'une économie alternative plus responsable, de plus en plus de produits sont transformés puis

réutilisés. Quels sont les risques vis-à-vis de ces traits ? Un fractionnement ou une transformation chimique peut-elle créer des produits secondaires toxiques ? comment assurer une sécurité alimentaire ? comment gérer des produits réutilisés et sortis de leur fonction « primaire » ? La production de C.O.V ou de métabolites secondaires peut-elle, à long terme être mauvaise pour l'homme, ou les animaux ? Il faut savoir que les aliments issus de NBT qui présenteraient une composition significativement modifiée du point de vue de la valeur nutritionnelle, du métabolisme ou de la teneur en substances indésirables, relèveront du règlement sur les nouveaux aliments et de ses exigences spécifiques en matière d'étiquetage RÈGLEMENT (UE) 2015/2283.