

# **Les Nouvelles Techniques de Sélection des Plantes**

Alain Toppan  
Limagrain



# Les nouvelles techniques de sélection

*Les besoins de l'amélioration des plantes*

- « Anciennes » et « nouvelles techniques de sélection »
- Origine des « NBT » et tendances actuelles
- Les besoins du sélectionneur et la diversité génétique
- Les dernières techniques
- Quelles applications ?
- Propriété intellectuelle et réglementation
- Risques et opportunités

# Origine des « Nouvelles techniques »

*Plusieurs "origines"*

- La Hollande dès 2007, en réunion des Autorités compétentes sur les OGM (Directive 2001/18/EC) demande de créer un groupe de travail sur « les nouvelles techniques qui sont appliquées en amélioration des plantes et aux modification des organismes en général »
  - Les produits de ces nouvelles techniques sont-ils OGM ?
- Le règlement «Aliments nouveaux» (258/97 et 2015/2283 introduit la date du 15 mai 1997 (procédé de production non utilisé à cette date et conduisant à des modifications de composition)
- L'avancée des connaissances scientifiques

# Quelles techniques ?

*Un catalogue hétéroclite dressé en 2007*

- Mutagenèse dirigée à l'aide d'oligonucléotides
  - Technologie des nucléases à doigt de zinc (ZFN-1, ZFN-2 et ZFN-3 ) (Site-Directed Nucleases ou SDN)
- Cisgénèse et intragénèse
- Greffage
- Agro-infiltration
- Méthylation de l'ADN ARN-dépendante (RdDM)
- Sélection inverse
- Génomique de synthèse
- Une focalisation depuis quelques années sur les techniques SDN-1, SDN-2 et SDN-3 pour leur efficacité

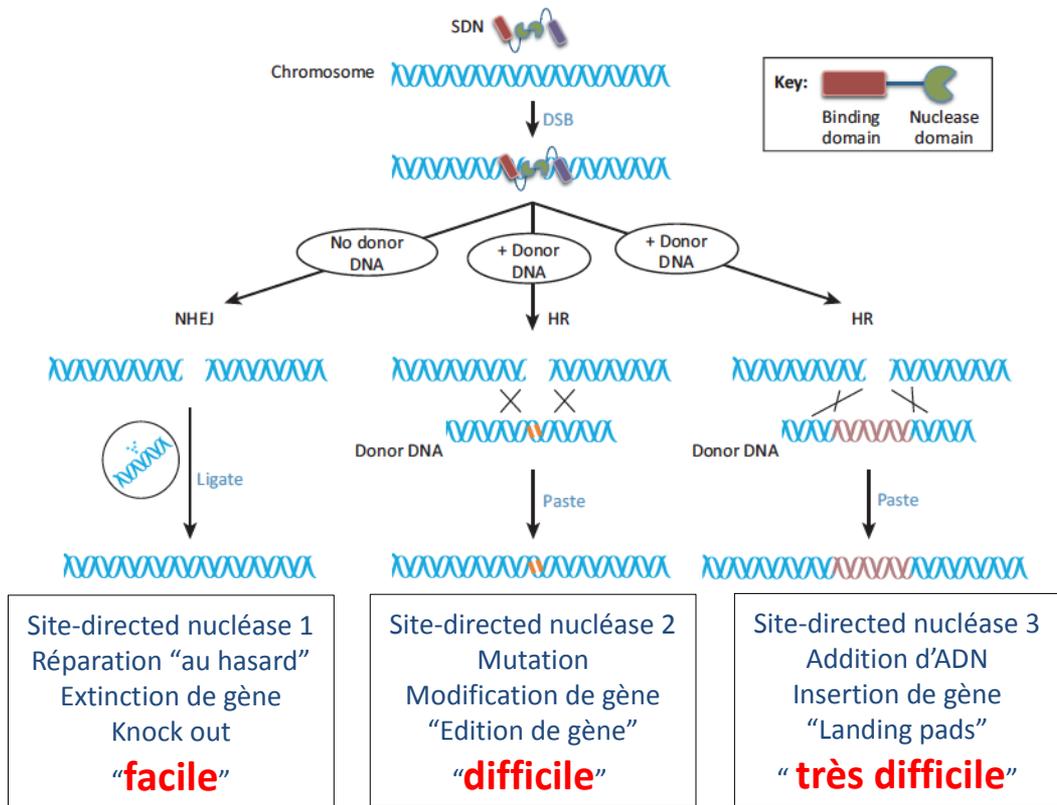
# Site-directed nucleases 1, 2 et 3?

*Des mécanismes communs, des produits différents*

- Le point commun: une coupure double brin de l'ADN sur un site spécifique et unique du génome
  - SDN-1 : réparation de l'ADN, soudure au site de coupure et perte ou changement de quelques bases
  - SDN-2 : utilisation d'une matrice d'ADN qui permet de modifier ou insérer quelques bases pré-déterminées au site de coupure
  - SDN-3 : insertion d'une séquence d'ADN longue (transgène) dans un site spécifique et unique du génome

# Site-directed nuclease 1, 2 et 3

## Représentation schématique de leur action





# Amélioration et diversité génétique

*Le sélectionneur a besoin de diversité pour créer des variétés*

- Une variété c'est une combinaison unique de gènes (la meilleure combinaison!)
- A partir du « germplasm » disponible (et parfois limité)
- A partir de sources « exotiques » (mais d'accès complexe)
- A partir de mutants naturels ou induits
  - Une modification de une seule à des milliers de bases
  - Issus du repérage dans une population de plantes jusqu'à l'utilisation de techniques sophistiquées

# Les sources de nouvelle diversité (1)

## *La mutagenèse induite*

- L'irradiation (International Atomic Energy Agency, Vienne)
  - 3200 variétés, 210 espèces, 70 pays
- Les agents mutagènes chimiques
  - Ethyl méthane sulfonate (EMS) et diverses molécules
- Il faut rechercher le « bon » mutant par un travail de phénotypage important associé à une ségrégation des mutations créées, parfois nombreuses
- Plusieurs générations de rétro-croisements sont nécessaires avant l'utilisation de la diversité générée

# Les sources de nouvelle diversité (2)

## *La transgénèse*

- Introduction de nouveaux gènes-caractères
  - Essentiellement à partir d'autres organismes
  - Un niveau et un lieu d'expression adaptés
  - Gène unique ou empilement génétique ou moléculaire
  - Des coûts de mise en marché énormes (sans fin?)
  - Des effets collatéraux (présence fortuite, traçabilité, licences, limitations d'utilisation, etc)

# Créer et exploiter les cassures de l'ADN

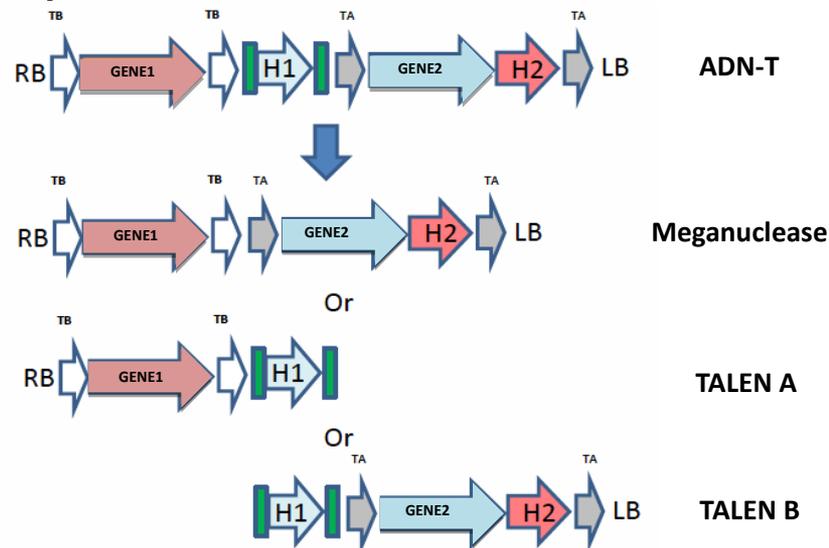
*Coupure par les nucléases de sites génomiques spécifiques*

- Méganucléases
  - Nucléases à doigts de zinc
  - TALEN (« Transcription activator-like effector nucleases »)
  - CRISPR/CAS (« Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats »)
- ↓
- D'utilisation de plus en plus simple, un nombre de plus en plus grand de sites potentiels de mutation, un coût de plus en plus faible et des applications possibles en grand nombre
  - Ces techniques sont brevetées et donc d'accès réservé

# Les premières utilisations (1)

*Excision de séquences longues et spécifiques*

- L'édition d'ADN-T a été possible avec les méganucléases et TALEN
- L'ADN-T introduit comprend des séquences de reconnaissance
- Création de nouveaux ADN-T après croisement avec une lignée contenant la nucléase
- Un cas particulier : élimination du gène marqueur de sélection



# Les premières utilisations (2)

## *Insertion ciblée de courtes séquences d'ADN*

- Création de « landing pads » pour de l'insertion ciblée future
  - Choix du « meilleur » locus d'insertion
  - Evite l'insertion dans un gène endogène ou dans un QTL important ou encore la création de nouveaux peptides
  - Assure un niveau d'expression optimal du transgène
  - Réduit les coûts de développement de nouveaux OGM
- Fonctionne laborieusement sur différentes espèces, les cassures d'ADN améliorent l'efficacité d'insertion

# Les techniques les plus récentes

## *TALEN et systèmes Crispr*

- Différentes utilisations pour différents objectifs
- Fonctionnent très bien pour les stratégies de knock-out (extinction de gène, SDN1), plus laborieusement pour générer du knock-in (édition de gènes, SDN2)
- L'insertion - remplacement de gène (SDN3) présente une efficacité limitée, loin de la routine pour des projets appliqués

# Les systèmes Crispr (1)

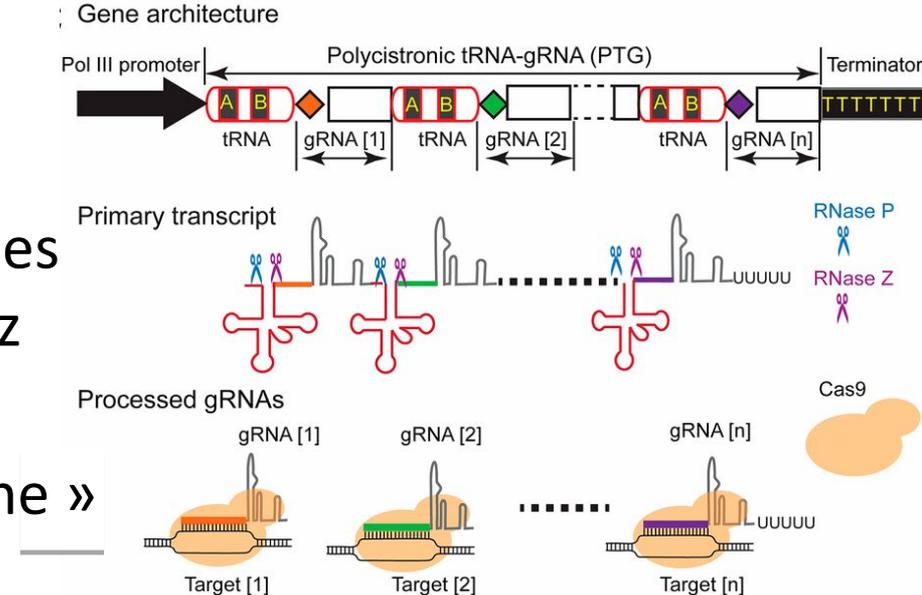
## *Les avantages*

- Supérieurs à la mutation chimique
- L'EMS génère uniquement des mutations GC-AT
- Le Tilling vise à obtenir une mutation dans un gène donné mais l'EMS utilisé produit des centaines de mutations dans le génome, qu'il est nécessaire de ségréger avant l'étude
- La mutation chimique ne permet pas la délétion/insertion ou le changement de phase de lecture
- Le taux de mutation simultané pour un gène donné dans une espèce polyploïde est très voisin de 0

# Les systèmes Crispr (2)

*Une efficacité inégalée*

- Un nouvel outil pour la génomique fonctionnelle, très efficace
- L'expression d'un tARN-gARN polycistronique peut fournir de multiples guides ARN
- Plus de 50 gènes/régions ciblées et mutées simultanément chez *Arabidopsis* ou le riz
- Une amélioration « quotidienne » des techniques



# Edition des génomes et applications

*Les cibles sont nombreuses mais il existe des limites*

- Les caractères monogéniques ou oligogéniques sont les plus accessibles :
  - Composition des plantes (huile, amidon, protéines, ...) et résistance aux maladies (fongiques, bactériennes ou virales)
- Quelques rares exemples de caractères quantitatifs
- Des cibles plus nombreuses pour les espèces potagères ?
- Une « relecture » nécessaire des séquences de génomes pour déterminer de nouvelles cibles?

# Les modifications sur la qualité

*Des produits en cours de développement*

- Blé résistant à l'oïdium par mutation simultanée (CRISPR/Cas et TALEN) de 3 gènes homéologues
- Maïs « waxy » riche en amylopectine
- Riz résistant à *Magnaporthe* (rice blast)
- Soja riche en acide oléique
- Pomme de terre ne brunissant pas, à meilleure conservation
- Tomate à maturation retardée, concombre résistant aux virus
- Champignon de couche ne brunissant pas

# Les modifications sur le rendement

*Encore peu nombreuses mais élégantes*

- Un premier résultat chez le maïs : des variants du gène ARGOS8 générés à l'aide de CRISPR-Cas9 en remplaçant ou insérant un nouveau promoteur issu du maïs
- Un rendement en grain amélioré en conditions de stress hydrique, lié à une expression plus élevée que dans la diversité du germplasm et qui augmente la tolérance pendant la floraison

# D'autres application en conversion

*Possibilité de lever rapidement des blocages génétiques ?*

- Certains gènes sont difficiles à associer durant la sélection (la recombinaison est faible dans certaines zones)
- Ces techniques pourraient résoudre cette difficulté, avec en préalable une très bonne efficacité de la technique et une excellente connaissance des gènes et allèles
- Des techniques « multiplex » pour un pyramidage efficace



# Des systèmes efficaces, mais techniques!

*La communication, simpliste, oublie les bases techniques !*

- ***Les étapes de base incluent la transgénèse: intégration de la machinerie, édition puis ségrégation***
- ***Transgénèse et culture in vitro des espèces cibles et de lignées élite doivent être maîtrisées***
- Une amélioration: gARN et protéine Cas9 introduits dans des protoplastes qui sont régénérés (pas d'ADN utilisé-transféré)
- Une incertitude: la réglementation sur les nuls ségrégants

# Une propriété industrielle dense

## *Quelques éléments du paysage complexe*

- Crispr-Cas9: brevets Broad Institute MIT and Harvard, Berkeley, Vilnius, etc
- Le 15 février 2017 l'office US des brevets a débouté Berkeley pour l'utilisation sur les eucaryotes (absence d'interférence)
- Licences CRISPR/Cas : Dupont-Pioneer et Caribou, Monsanto et Broad Institute, ERS Genomics et Bayer Crop Science, CRISPR Therapeutics and Bayer Crop Science (489 familles de brevets sur le sujet)
- TALENs : Calyxt et BPL ont des contrats sur le maïs, le blé et le riz, et avec Monsanto, BASF et Bayer Crop Science
- Nucléases à doigts de zinc : Dow a signé avec Sangamo (EXZACT®)
- Dow et Monsanto : option non-exclusive et globale, licence sur EXZACT®
- *Un accord de licence est nécessaire avant tout développement de produit!*

# Quelle réglementation? (1)

*OGM ou non, que faut il adapter ?*

- La question initiale : les produits des nouvelles techniques de sélection sont ils à réglementer comme des OGM?
- Quelques pays ont déjà un système réglementaire qui peut absorber ces nouveaux produits
- Les Etats-Unis : un système à 3 portes. APHIS-USDA a déjà tranché sur certains produits, mais certains auront à passer par la FDA ou même l'EPA
- Le Canada a une approche basée sur le produit
- L'Argentine propose une pré-lecture pour orienter le futur dossier de demande de mise sur le marché

# Quelle réglementation? (2)

*Rationalité ou idéologie ? Science ou peurs?*

- Selon les pays, **techniques** et/ou **produits** définissent ce qui est OGM
- L'Europe a commencé à étudier les nouvelles techniques dès 2007 et cherche encore (lentement) si le cadre réglementaire des OGM peut être utilisé pour évaluer les produits de l'édition des génomes
- La publication de l'analyse légale européenne est constamment repoussée
- Des pays ont « tranché » (Suède, Finlande), d'autres avancent (Hollande, Allemagne) parfois chaotiquement.
- La saisine par le Conseil d'Etat de la Cour de Justice européenne sur la mutagenèse peut conduire à une décision tardive et dévastatrice!
- L'OCDE a un groupe de travail ainsi que la plupart des pays industrialisés.

# Réglementation: risques et opportunités

*Aube ou crépuscule ?*

- L'insertion d'ADN conduit à des OGM (SDN3), mais les produits d'édition du génome (petites insertions/délétions, petites modifications) (SDN2 et 3) ne devraient pas être considérés OGM
- Les coûts vont décourager tout investissement (et notamment de la part des PME!)
- Des pertes de compétitivité sont à craindre!
- Le pire des scénarios: des produits différemment réglementés selon les territoires,
- Des ruptures commerciales et dans la sélection variétale mais des coûts associés !
- Propriété intellectuelle et liberté d'opérer doivent être clarifiées
- Source de connaissance et de variabilité utiles à l'amélioration des plantes
- Source de produits nouveaux (qualité et quantité) adaptés à des marchés de niche et également aux espèces de grande culture



**Merci pour votre attention!**