

Réécriture génomique, outil d'obtention de résistance aux parasites et pathogènes des plantes cultivées



Georges Pelletier, agronome et généticien, a effectué sa carrière à l'Inra (1967-2008) où ses recherches ont porté sur la reproduction des plantes et la modification de leurs génomes cytoplasmiques (plastides et mitochondries) par des approches de fusion cellulaire, ou de leurs génomes nucléaires par transfert de gènes. Ses travaux ont connu des applications en sélection, en particulier chez les Brassicacées (crucifères). De 2002 à 2010 il a présidé le directoire de Genoplante, le programme français de génomique végétale qui a permis la réalisation de plus de 300 projets nationaux et en collaboration avec d'autres pays d'Europe. Laurier d'excellence de l'Inra en 2006, Georges Pelletier est membre de l'Académie des sciences et de l'Académie d'agriculture de France.

Résumé : D'innombrables parasites et pathogènes provoquent à l'échelle mondiale des pertes importantes de la production végétale agricole. Les échanges internationaux et les perspectives climatiques vont dans le sens d'une aggravation de cette pression parasitaire. Une voie efficace pour y répondre est d'exploiter la résistance génétique que les sélectionneurs développent depuis le siècle dernier. La méthode originale de réécriture (« editing » en anglais) ou modification ciblée du génome, dont les outils se perfectionnent sans cesse, stimule la recherche dans le domaine des interactions entre une plante hôte et ses pathogènes afin de créer des résistances par inactivation ou modification de gènes candidats. De nombreux résultats concrets ont déjà été obtenus mais, alors que ce domaine de recherche est en plein essor dans le monde, les freins à ses applications sont actuellement réglementaires et politiques en Europe.

La production agricole est soumise aux aléas, souvent liés, du climat et de la pression de parasites et de pathogènes attaquant les végétaux. Le passage de la polyculture ancestrale sur de petites parcelles à un paysage agricole avec un nombre limité d'espèces sur de grandes surfaces favorise l'exposition à une très large diversité d'ennemis et leur prolifération : virus, viroïdes, bactéries, champignons, oomycètes, nématodes, arthropodes, mollusques, plantes parasites... Une étude récente (1) portant sur les 5 principales productions, qui représentent près de 50% de l'apport calorique pour la population mondiale, situe ces pertes entre 20 et 30% en moyenne : 21,5% pour le blé, 30% pour le riz, 22,6% pour le maïs, 17,2% pour la pomme de terre, et 21,4% pour le soja. Les pertes de production agricole sont très variables selon les régions du monde, la latitude et les méthodes de contrôle qui sont appliquées, les parasites

et pathogènes affectant plus les productions végétales des régions les moins favorisées du point de vue socio-économique. L'émergence de « nouveaux » pathogènes comme certaines races de rouille du blé ou la prolifération de plantes parasites comme la Striga du maïs sont aussi une cause majeure de ces pertes.

LES RÉSISTANCES GÉNÉTIQUES POUR RÉDUIRE L'IMPACT DES ENNEMIS DES CULTURES

Lors de l'attaque d'un agent pathogène, la plante dispose d'un système de défense qui fait appel à des mécanismes cellulaires qui détectent le pathogène à la surface et à l'intérieur de la cellule. Ces mécanismes sont basés sur des récepteurs moléculaires qui reconnaissent des motifs moléculaires propres à ces pathogènes, ou induits par ces derniers au niveau des cellules hôtes. Cette reconnaissance déclenche l'activation des réactions immunitaires de la plante qui interrompent la croissance ou la multiplication des pathogènes (cf. l'article de S. Gianinazzi page 36). Les gènes impliqués sont donc des « gènes de résistance » (R) génétiquement dominants mais qui, reposant sur des reconnaissances moléculaires très spécifiques, sont parfois contournés. Ainsi certaines races ou variantes du pathogène peuvent, dans une course aux armements entre l'hôte et son pathogène, produire de nouveaux motifs moléculaires qui échapperont à cette reconnaissance et aux réactions d'immunité de la plante.

Les méthodes traditionnelles de sélection utilisent largement ces gènes de résistance

La recherche de ces gènes végétaux de résistance aux pathogènes, réalisée le plus souvent dans des espèces

sauvages apparentées aux plantes cultivées, et leur exploitation pour l'amélioration des variétés a été, et demeure, une des activités principales des sélectionneurs. Par exemple, les croisements de la tomate cultivée, *Solanum lycopersicum*, avec des espèces sauvages voisines (*S. hirsutum*, *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S. pimpinellifolium*, etc ...) ont été largement utilisés pour conférer à la première des résistances vis-à-vis des parasites tels que bactéries, virus, champignons. En 1943, le croisement d'un pommier cultivé, *Malus domestica*, avec *Malus floribonda*, espèce sauvage résistante à la tavelure, a été réalisé aux Etats-Unis. Partant du matériel végétal obtenu, plus résistant à cette maladie fongique, les chercheurs de l'Inra produiront dans les années 1970 la variété « Ariane », commercialisée en 2005 et nécessitant moins de traitements antifongiques.

De larges séquences d'ADN, associées aux gènes de résistance de ces espèces sauvages et acquises lors des croisements, persistent dans le génome des variétés modernes des plantes cultivées. Le transfert de gènes de résistance peut même être réalisé quand le croisement entre des espèces différentes n'est pas possible. Ainsi, le croisement entre *Aegilops ventricosa* (égilope ventru), résistant au piétin-verse, et *Triticum durum* (le blé dur) (2) a donné un hybride qui, suite au doublement de ses chromosomes par un traitement à la colchicine, a pu être croisé avec le blé tendre *T. aestivum*. La résistance au piétin-verse d'*A. ventricosa* a pu ainsi être transférée au blé tendre, ce qui a permis aux équipes de l'Inra de créer la variété « Renan », cultivée depuis 1989 dans les systèmes de cultures à faibles intrants. Par ailleurs, le gène de résistance à la maladie fusariose de l'épi présent chez *Thinopyron elongatum*, herbe pérenne d'Eurasie, provient d'une transmission spontanée au génome de cette plante d'un gène d'un champignon endophyte des graminées (*Epichloë*). Ce « transgène » a été ensuite transféré au blé tendre par croisement interspécifique avec *T. elongatum*.

Ces méthodes requièrent de nombreuses années car le croisement initial avec les espèces sauvages apporte des caractéristiques indésirables que la domestication et la sélection avaient éliminées chez les espèces cultivées. Des croisements successifs d'amélioration sont nécessaires pour s'en débarrasser partiellement.

Les gènes de sensibilité pour une meilleure durabilité des résistances

Plantes hôtes et pathogènes entretiennent de nombreuses interactions au niveau moléculaire. Pendant l'infection, les pathogènes sécrètent un arsenal de molécules appelées effecteurs et produites par de très nom-

breux gènes, qui comprennent des protéines enzymatiques dégradant les parois végétales (permettant leur approvisionnement en sources carbonées et azotées) ou des toxines qui altèrent les fonctions vitales de la plante. Ces effecteurs ciblent des gènes végétaux et les inactivent par mutation, ce qui va altérer la capacité du pathogène à provoquer la maladie. Il en est de même pour des gènes codant des protéines impliquées dans le développement de la plante hôte et dont le pathogène a besoin pour se développer. Ces gènes, dits de sensibilité (gènes S), une fois inactivés par mutation, réduiront la capacité du pathogène à provoquer la maladie et entraîneront donc une certaine résistance. Une condition pour l'utilisation pratique de telles mutations pour obtenir des plantes résistantes est que la plante ait la possibilité de s'adapter à leur absence.

Les résistances obtenues à partir de pertes de fonctions de ces gènes végétaux S, induites par mutations, se présentent comme des alternatives qui ont un plus grand potentiel de durabilité que les résistances portées par les gènes R, car leur contournement par le pathogène suppose que ce dernier « réinvente » la fonction de la plante qui lui fait défaut. L'exemple typique d'un gène végétal de sensibilité à une maladie fongique est celle du gène appelé Mlo qui code une protéine transmembranaire nécessaire à la pénétration de l'agent pathogène de l'oïdium à travers la paroi végétale. Dans le monde, environ 10 000 espèces végétales sont contaminées par plus de 650 espèces de ce champignon. Des résistances vis-à-vis de l'oïdium ont d'abord été découvertes chez l'orge où elles sont conférées par des mutations de perte de fonction du gène Mlo (3). De nombreuses variétés d'orge possédant cette résistance sont cultivées depuis près de 50 ans, sans contournement, et qui est effective quelle que soit la souche de champignon. Depuis des résistances spontanées du même type ont été découvertes chez des espèces aussi différentes que le melon, le pois, la tomate, le concombre, le tabac. Cependant, elles ont en général un coût physiologique pour la plante mais qui peut être ensuite atténué par sélection.

LA RÉÉCRITURE (OU « ÉDITION ») GÉNOMIQUE AU SERVICE DES PLANTES CULTIVÉES

Des méthodes de modification ciblée des génomes se sont développées ces dernières années pour apporter des modifications de la séquence d'ADN en un site choisi du génome. Elles reposent sur l'utilisation d'enzymes, les endonucléases, qui coupent l'ADN nucléaire à des endroits précis ; les plus utilisées s'appellent TALEN (*Transcription activator-like effector nucleases*) et CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic*

Repeats). Dans la méthode TALEN, le site de coupure est reconnu par les domaines de liaison à l'ADN de protéines chimériques comportant également une activité nucléase. Le système CRISPR/Cas9, dont l'invention a été reconnue par un Prix Nobel à E. Carpentier et J. Doudna en 2020, est d'origine bactérienne pour lutter contre les virus à ADN chez des bactéries (bactériophages). Dans la méthode CRISPR Cas (4), la nucléase Cas (Cas9 ou d'autres depuis) est associée à un ARN « guide » qui la positionne par complémentarité à l'un des deux brins d'ADN, et réalise ainsi une coupure à un site déterminé de l'ADN du gène cible.

Utilisant l'une ou l'autre de ces deux méthodes, dites de ciseaux moléculaires, une séquence donnée dans le génome subit une coupure franche des deux brins d'ADN, ce qui permet par la suite trois types d'interventions sur ce génome (Fig. 1). Dans le type d'intervention dit SDN1 (pour *Site Directed Nuclease*), tout comme des coupures d'ADN qui se produisent régulièrement dans la vie de la cellule, celle-ci répare immédiatement la coupure, quelquefois avec une erreur par perte ou insertion de nucléotides, comme lors d'une mutation

spontanée. SDN1 dans un gène conduira alors à l'inactivation de ce gène. Alternativement, la réparation de la coupure de l'ADN peut être réalisée en présence d'une matrice d'ADN fournie à la cellule et homologue de la région coupée, mais différente par une ou plusieurs nucléotides. Ce type d'intervention, dit SDN2, s'apparente au remplacement d'un allèle (variant) par un autre par croisement et sélection. Dans le troisième type d'intervention, dit SDN3 ou transgénèse ciblée, la réparation de la coupure de l'ADN est réalisée en fournissant une matrice d'ADN homologue à ses bordures et contenant un transgène (gène étranger ou non à l'espèce et apportant un nouveau caractère), qui va s'insérer par recombinaison homologue au site de coupure.

D'autres méthodes de réécriture dérivées des propriétés du système CRISPR ont été développées pour réaliser des modifications de plus en plus précises, en ciblant individuellement les bases nucléiques qui constituent des brins de l'ADN. Des protéines hybrides entre la nucléase Cas9, dont on a inactivé la fonction nucléase, et une cytidine désaminase ou une adénosine désaminase permettent respectivement de transformer chimique-

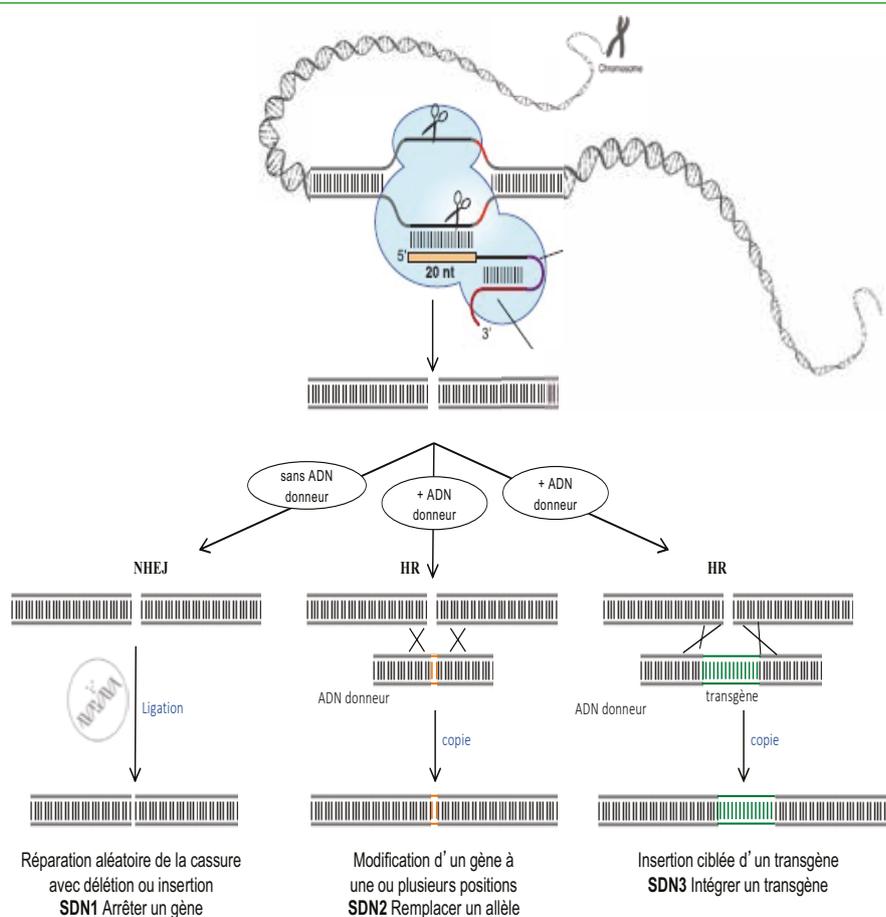


Fig. 1 : Ciseaux moléculaires (CRISPR Cas9) qui réalisent la coupure des deux brins de la molécule d'ADN dans un site déterminé, et trois types d'interventions d'édition génomique ciblées sur un seul site d'un génome (SDN1, SDN2, SDN3) (voir texte).

ment une base cytidine (C) en uridine (U), ou une base adénine (A) en guanine (G), apportant un degré de précision jamais atteint auparavant dans l'édition génomique. De plus, l'association d'une reverse transcriptase à Cas9 inactivée et la prolongation de l'ARN guide par une séquence destinée à être convertie en ADN permet la réécriture directe d'une plus longue séquence du génome (*prime editing* en anglais) (5).

LA RÉÉCRITURE GÉNOMIQUE ET LA RÉSISTANCE AUX MALADIES

L'inactivation d'un gène (voir Fig.1, SDN1) est l'opération de réécriture génomique la plus facile à réaliser. Ici, quelques exemples de son application sont donnés avec les avantages et désavantages (6). L'inactivation du gène *SlJAZ2* de la tomate induit une résistance à la bactérie pathogène *Pseudomonas syringae*, agent de la mouche bactérienne, tandis que celle d'un autre gène, *Dmr6*, résulte en une résistance à la même bactérie et à d'autres du genre *Xanthomonas*, ainsi qu'à l'oomycète *Phytophthora capsici* causant la pourriture du collet et des fruits. Chez le riz, le gène *OsCYP71A1* est responsable de la synthèse de sérotonine induite par l'attaque de certains insectes dont l'activité herbivore en dépend. L'inactivation de ce gène bloque la synthèse de sérotonine et rend alors le riz résistant aux attaques de la cicadelle brune et de la pyrale rayée du riz, insectes particulièrement dévastateurs en Asie. Cette résistance aux insectes herbivores du riz s'accompagne, par ailleurs, d'une meilleure résistance à la pyriculariose *Magnaporthe grisea* mais une plus grande sensibilité à l'helminthosporiose, *Bipolaris oryzae*. Les résistances obtenues par l'inactivation complète d'un gène peuvent

l'inactivation des trois paires de gènes *Mlo* du blé (qui possède trois génomes A, B, D), par la méthode de réécriture génomique TALEN, rend le blé tendre résistant à l'oïdium mais induit une maturation prématurée de la plante qui diminue le rendement. Un travail de sélection est alors nécessaire pour compenser ces pertes.

Aussi des stratégies plus élaborées ont été mise en œuvre pour restreindre l'inactivation du gène de sensibilité à la seule présence du pathogène. C'est le cas du gène appelé *SWEET14* du riz, qui est impliqué dans le transport au niveau cellulaire des sucres, source de carbone pour la bactérie pathogène *Xanthomonas oryzae*. Le promoteur contrôlant l'expression de ce gène a été modifié pour empêcher la fixation des protéines bactériennes qui peuvent activer la transcription de ce gène. Ainsi, les plantes montrent un certain niveau de résistance car la bactérie se trouve privée de sucre ; leur développement reste par ailleurs normal car le gène conserve son activité cellulaire en l'absence du pathogène. La même stratégie a été utilisée pour obtenir une résistance au chancre des agrumes (orange et pomelos) en modifiant le promoteur du gène de sensibilité appelé *CsLOB1*.

Alors que le parasitisme des microorganismes est tourné vers leur nutrition, la multiplication des virus dépend de la machinerie cellulaire de leur plante hôte. Aussi des résistances peuvent être imaginées en modifiant des éléments de cette machinerie. Des exemples sont fournis par des résistances naturelles, comme la résistance aux potyvirus découverte chez le piment puis dans de nombreuses espèces végétales. Cette résistance repose sur des modifications dans la séquence du gène codant pour une protéine, *EIF4E*, qui intervient dans la synthèse protéique de la cellule hôte et avec laquelle le virus interagit pour se multiplier. Ces mutations n'empêchent que ces interactions et n'affectent pas l'activité d' *EIF4E* nécessaire à la synthèse des protéines de la cellule hôte. Il est alors possible de conférer la résistance à ces virus chez une espèce sensible à partir d'un génotype résistant d'une autre espèce (7) comme illustré dans la figure 2.

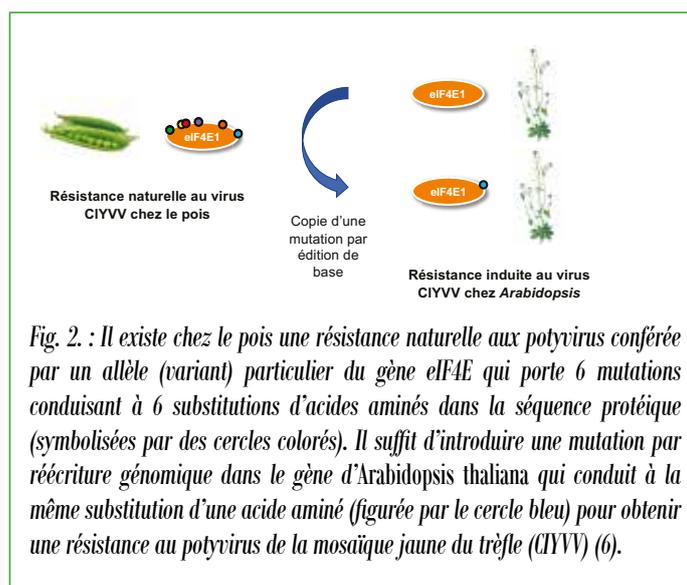


Fig. 2 : Il existe chez le pois une résistance naturelle aux potyvirus conférée par un allèle (variant) particulier du gène *eIF4E* qui porte 6 mutations conduisant à 6 substitutions d'acides aminés dans la séquence protéique (symbolisées par des cercles colorés). Il suffit d'introduire une mutation par réécriture génomique dans le gène d'*Arabidopsis thaliana* qui conduit à la même substitution d'une acide aminé (figurée par le cercle bleu) pour obtenir une résistance au potyvirus de la mosaïque jaune du trèfle (*CIYVV*) (6).

provoquer en retour des anomalies de développement plus ou moins pénalisantes pour la plante. Par exemple,

Cet exemple montre comment la connaissance précise de la fonction d'un gène, combinée aux possibilités de la réécriture génomique pour modifier sa séquence, permet d'obtenir une nouvelle résistance dans une espèce. Avec les progrès constants dans la compréhension des propriétés structurales et des mécanismes moléculaires d'action des récepteurs qui détectent la présence et l'activité du pathogène, on peut envisager que les méthodes de réécriture génomique permettront aussi dans un proche avenir la modification des gènes de résistance (R) pour leur conférer un plus large spectre de

reconnaissance des pathogènes et par conséquent une plus grande durabilité.

LES CONTRAINTES DES MÉTHODES DE LA RÉÉCRITURE GÉNOMIQUE

Le développement de ces méthodes se heurte à des obstacles de natures diverses :

- Sur le plan technique, la cellule végétale dans laquelle on introduit les réactifs nécessaires à la réécriture génomique doit être capable de régénérer ultérieurement une plante. Or, seulement un nombre limité d'espèces végétales se prêtent facilement à ces techniques de culture cellulaire. Si les réactifs sont introduits sous forme de transgènes qui s'intègrent au génome, cela implique qu'ils soient éliminés par ségrégation dans la descendance. Ceci n'est pas réalisable si l'on veut préserver les caractéristiques d'une variété reproduite par voie de multiplication végétative, comme c'est le cas de la vigne, du pommier ou de la pomme de terre par exemple. On peut alors faire en sorte que ces transgènes soient exprimés de façon transitoire ou introduire les complexes « Cas9-ARN » préassemblés dans des cellules débarrassées de leur paroi (protoplastes de tabac, laitue, le riz, vigne, pommier, pomme et la pomme de terre), ou dans des cellules embryonnaires par bombardement (maïs et blé), ou dans des zygotes après fécondation *in vitro* (cas du riz). Un savoir-faire inégalement maîtrisé.
- Sur le plan de la sécurité sanitaire et environnementale, certains s'attardent sur les dangers potentiels de l'induction de mutations ailleurs dans le génome qu'au niveau de la séquence cible. Chez les plantes, ces mutations « hors-cible » sont en nombre dérisoire comparé à celui des mutations induites par milliers par les méthodes de mutagenèse développées en sélection depuis près d'un siècle et considérées, à juste titre, comme sans danger.
- Sur le plan réglementaire, alors que ces modifications du génome sont « sans addition d'ADN étranger », l'Europe est actuellement soumise à l'arrêt de la Cour de justice européenne du 25 juillet 2018 qui classe les produits de la réécriture génomique dans la catégorie des Organismes génétiquement modifiés soumis à réglementation, alors que dans d'autres régions du monde (les Amériques par exemple), les premiers produits commercialisés ne sont pas ainsi considérés. Il est clair qu'un tel classement signifie pour la majorité des pays d'Europe une totale absence de développement de variétés végétales provenant de ces méthodes, laissant le leadership à la République populaire de Chine et à certains pays du continent américain. Une actualisation des directives

et règlements européens élaborés il y a plus de trente ans, à l'aune des connaissances scientifiques s'impose pour échapper à une telle censure.

- Sur le plan juridique et commercial se pose pour les sélectionneurs la question des droits de propriété intellectuelle sur les méthodes et outils de réécriture du génome. Pour les utilisateurs des variétés qui en dérivent, quel sera le régime auquel elles seront soumises : pour ce qui concerne l'Europe, le système original du Certificat d'obtention végétale (COV) qui laisse une liberté d'usage pour les sélectionneurs et les producteurs sera-t-il préservé ?

EN CONCLUSION

Les dernières années ont montré que les nouvelles possibilités de modification ciblée des génomes sont un puissant stimulateur de la recherche dans le domaine de la génomique végétale. Le développement en Europe de ces recherches et des applications qui pourront en résulter est fortement dépendant de décisions politiques à venir. Il est à souhaiter pour le secteur de la production de semences, où la recherche de résistances génétiques aux parasites et pathogènes est une activité majeure, que ces décisions ne seront pas, par idéologie, de nature à objectivement favoriser les ennemis des cultures.

RÉFÉRENCES

- (1) Savary S *et al.* (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution* 430 : 430–439.
- (2) Sears ER (1944) The amphidiploids *Aegilops cylindrica* x *Triticum durum* and *Aegilops ventricosa* x *T. durum* and their hybrids with *T. aestivum*. *Journal of Agricultural Research* 68 : 135-144.
- (3) Jorgensen JH (1992) Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* 63 : 141-152.
- (4) Jinek M *et al.* (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337 : 816-821.
- (5) Anzalone A V *et al.* (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576 : 149–157.
- (6) Zhang Y *et al.* (2018) Applications and potential of genome editing in crop improvement. *Genome Biology* 19 : 210 .
- (7) Bastet A. *et al.* (2019) Mimicking natural polymorphism in eI4E by CRISPR-Cas9 base editing is associated with resistance to potyviruses. *Plant Biotechnology Journal* 17 : 1736–1750.