

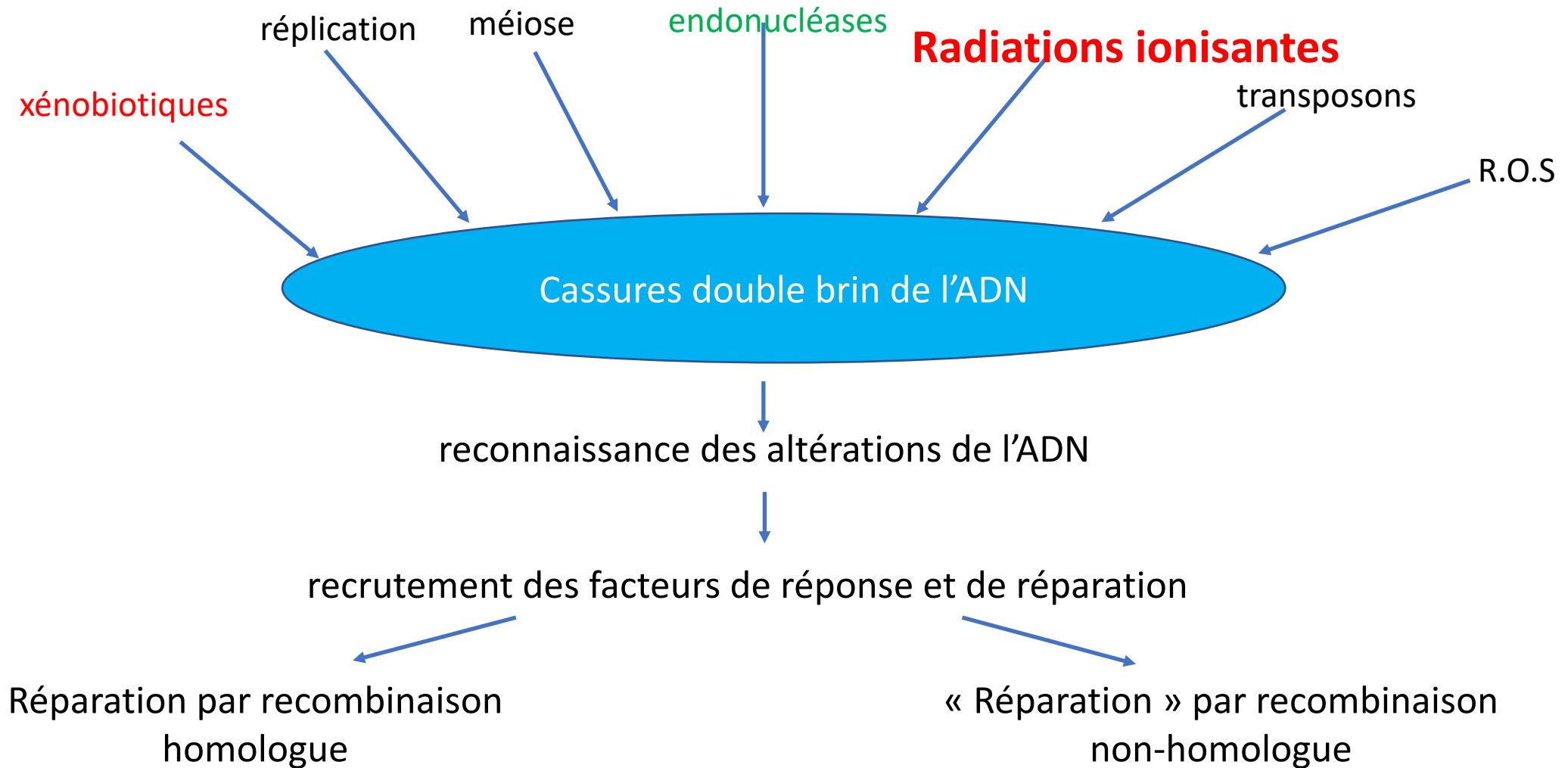
Modification ciblée des génomes par la technologie CRISPR-Cas9 : Nouveaux développements, nouveaux problèmes.

Académie des sciences 16 avril 2019

Réécriture génomique pour la sélection végétale

Georges Pelletier

Facteurs endogènes et **exogènes** induisant des cassures de l'ADN



Quelques artifices utilisés en sélection végétale

- Production d'haploïdes (nombre gamétique de chromosomes) (1922)
- Culture in vitro (sauvetage) d'embryons interspécifiques (1929)
- Echanges illégitimes entre chromosomes par irradiation (1930)
- Doublement du nombre des chromosomes par la colchicine (1937)
- Echanges de gènes entre espèces incompatibles par « espèces-ponts » (1944)
- Régénération de plantes à partir de cellules in vitro (1958)
- Hybridation par fusion de cellules somatiques (1972)
- Transgénèse (1983)

La mutagenèse chez les végétaux: une longue histoire

1. Des expériences de « mutagenèse » furent réalisées avant que les notions de gènes et de mutations soient établies.

Gager, C. Stuart, "Effects of the Rays of Radium on Plants," Mem. New York Bot. Gard., 4, 1-278, 1908. Results also presented before Sect. G, A. A. A. S., Jan., 1907.

2. Premières variétés commercialisées vers 1934 (tabac) (rayons X)

3. En 2015 plus de **3200** mutations répertoriées (déclarées) chez 170 espèces végétales, dans 60 pays différents.

Ces mutations sont utilisées en création variétale:

Par exemple la mutation « denso » d'orge (paille raccourcie), obtenue en 1965, avait été introduite en 1995 dans 150 cultivars différents qui ont pu servir à en créer d'autres depuis.

Pourquoi la mutagenèse?

- Mutations spontanées: beaucoup mais dispersées
- **Rendre accessibles les variations en multipliant leur fréquence (facteur 1000)**
- Corollaire : de nombreuses mutations « hors-cible »
- Nécessité de sélection (ultérieure)

La mutagenèse chez les végétaux: essentiellement de l'irradiation

Raina A. et al.
DOI :10.9734/ARJA/2016/29334

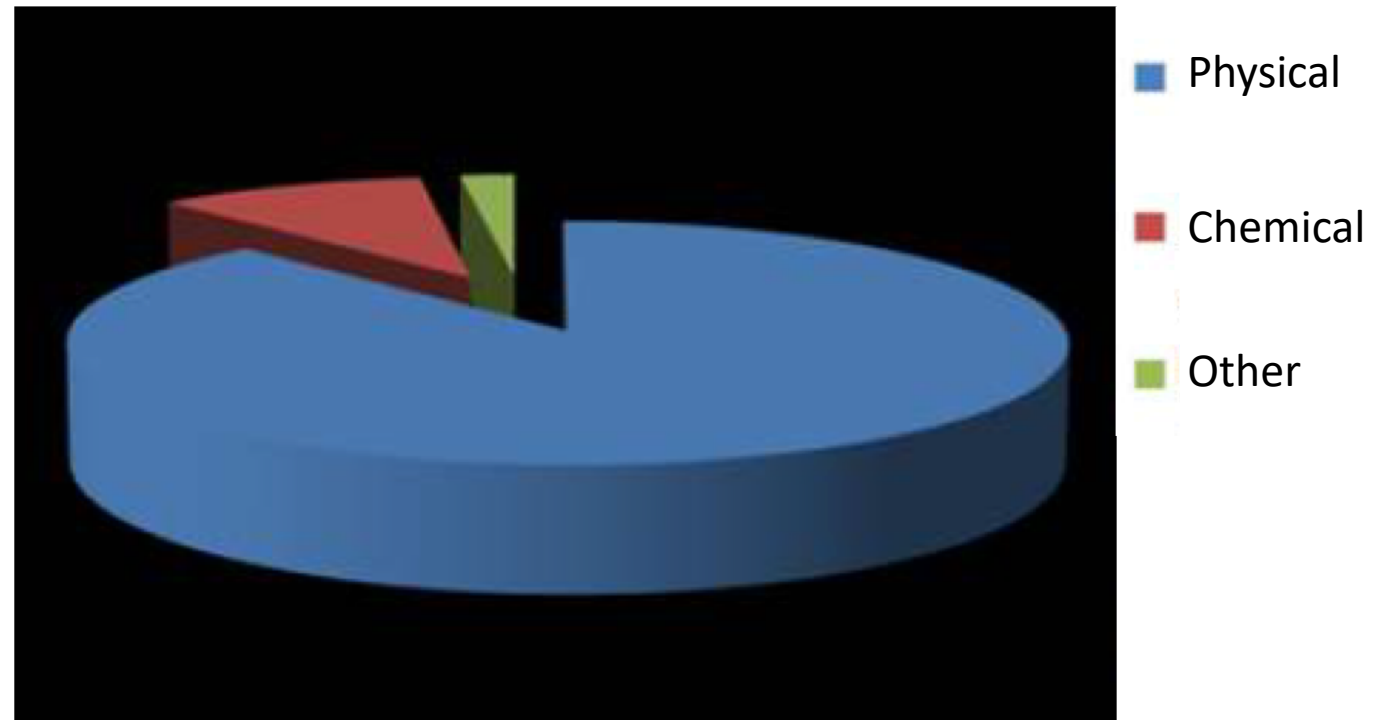


Fig. 4. Comparative use of different mutagens
*Data source: Officially released mutant varieties The
FAO-IAEA Database, 2015*

La mutagenèse chez les végétaux: un grand nombre de variétés

Raina A. et al.
DOI :10.9734/ARJA/2016/29334

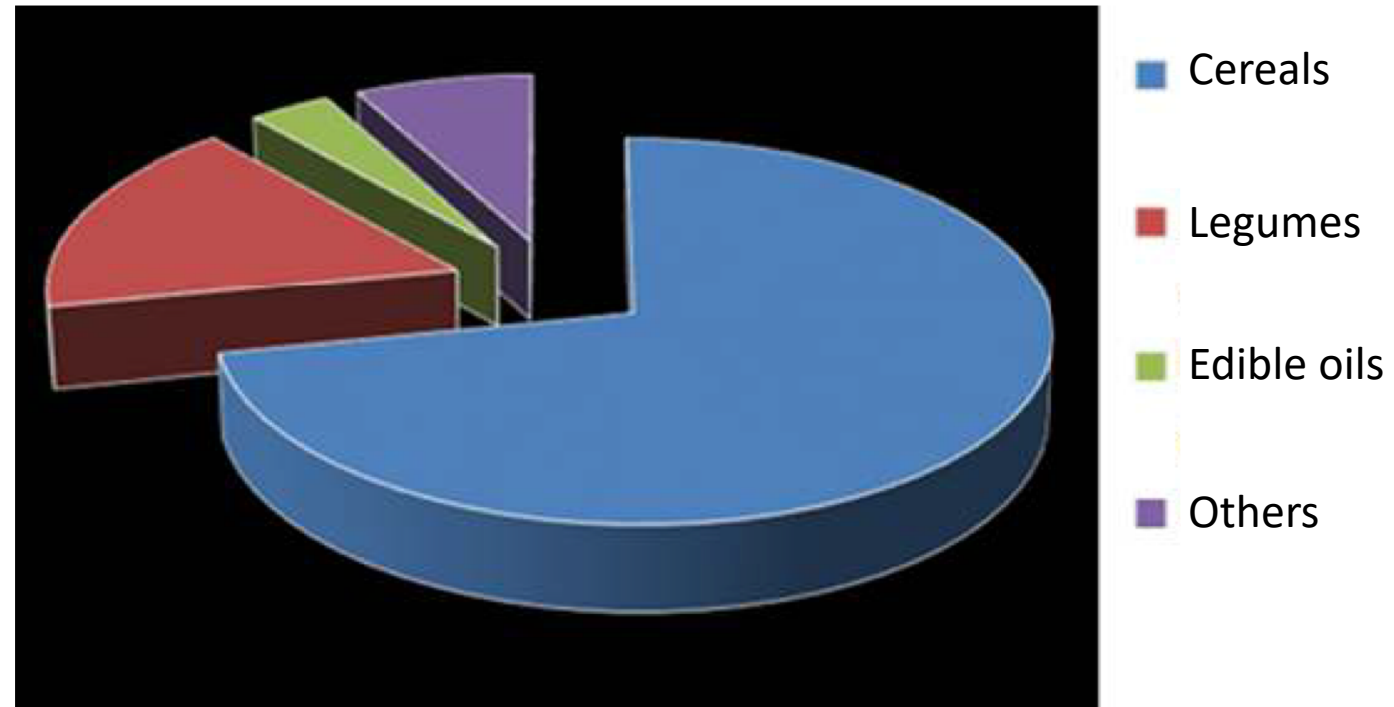


Fig. 3. Number of released varieties developed through mutation breeding in cereals and legumes

Data source: Officially released mutant varieties The FAO-IAEA Database, 2000

La mutagenèse chez les végétaux: dans de nombreux pays

Raina A. et al.
DOI :10.9734/ARJA/2016/29334

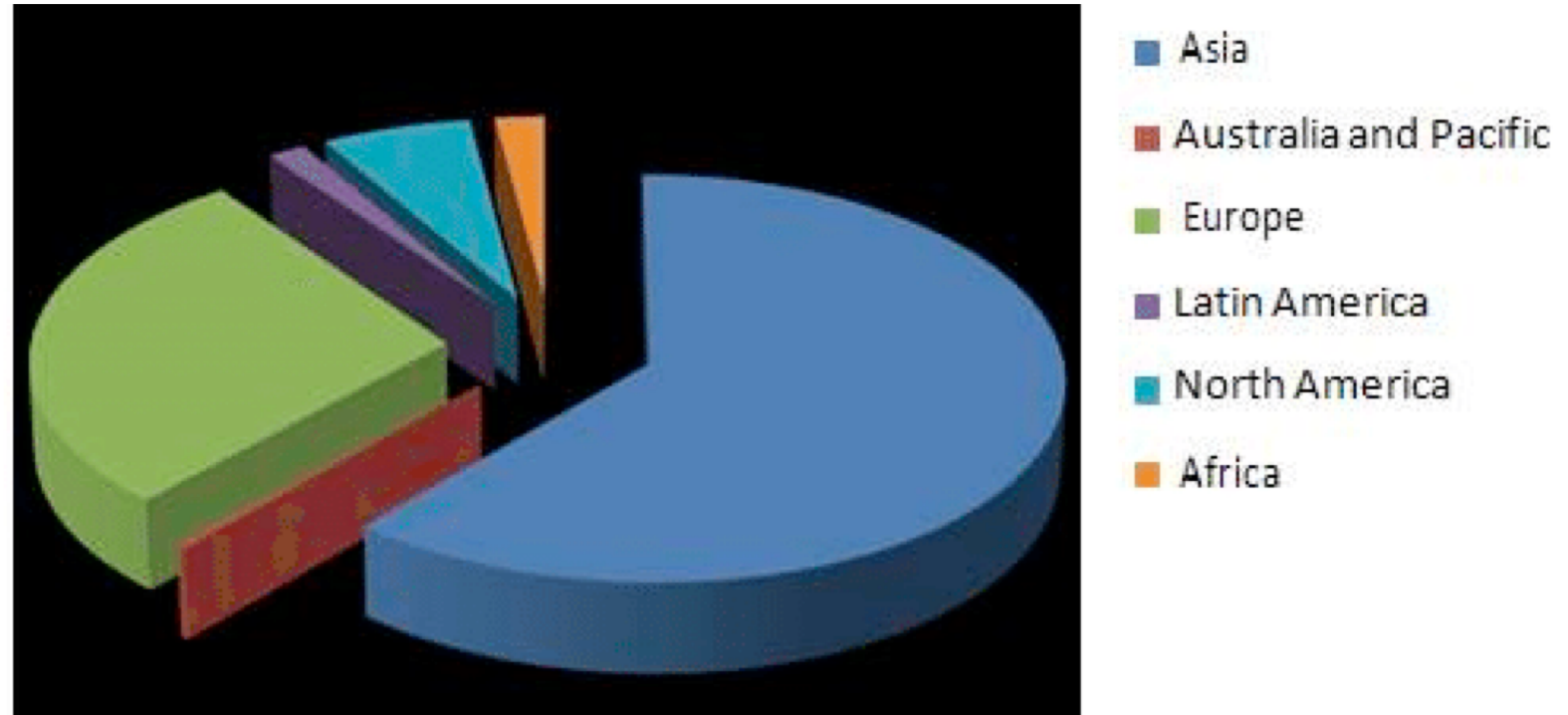


Fig. 1. Cumulative percent of a number of officially released mutants in various regions of the world

Data source: FAO mutant variety database May 2015

Les mutants obtenus après irradiation sont banalisés



Certified Organic

RIO STAR GRAPEFRUIT

- Bred from the two reddest grapefruit varieties: Rio Red and Star Ruby
- Discovered in Texas in the late 70s
- Overall blush on exterior peel
- Easy to peel; very few seeds
- Deep, red interior color
- Perfect for eating fresh or squeezed for a sweet glass of juice



Brought to you by,



Organically Grown Company

www.organicgrown.com



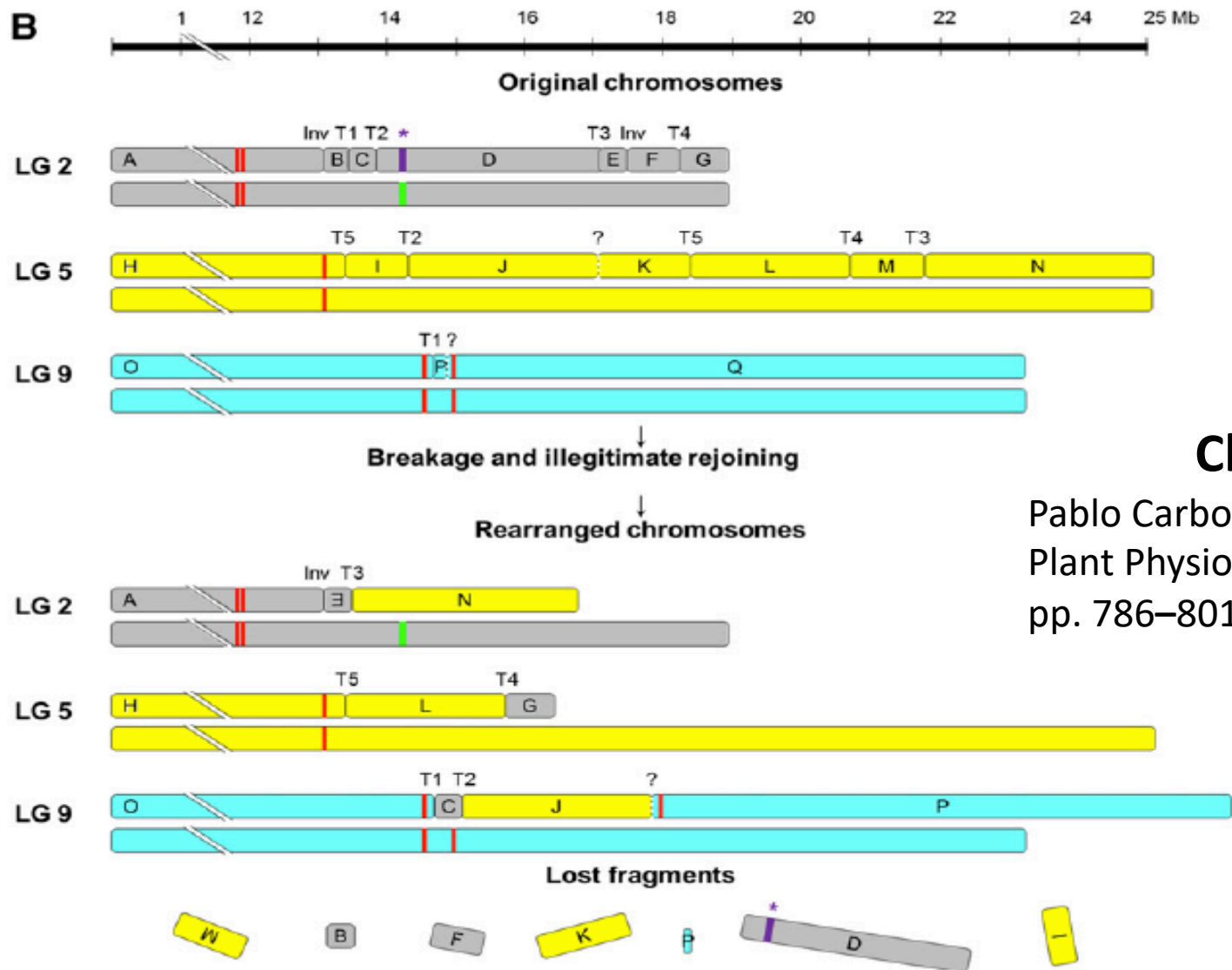
Tempranillo tinto

1987

Tempranillo blanco



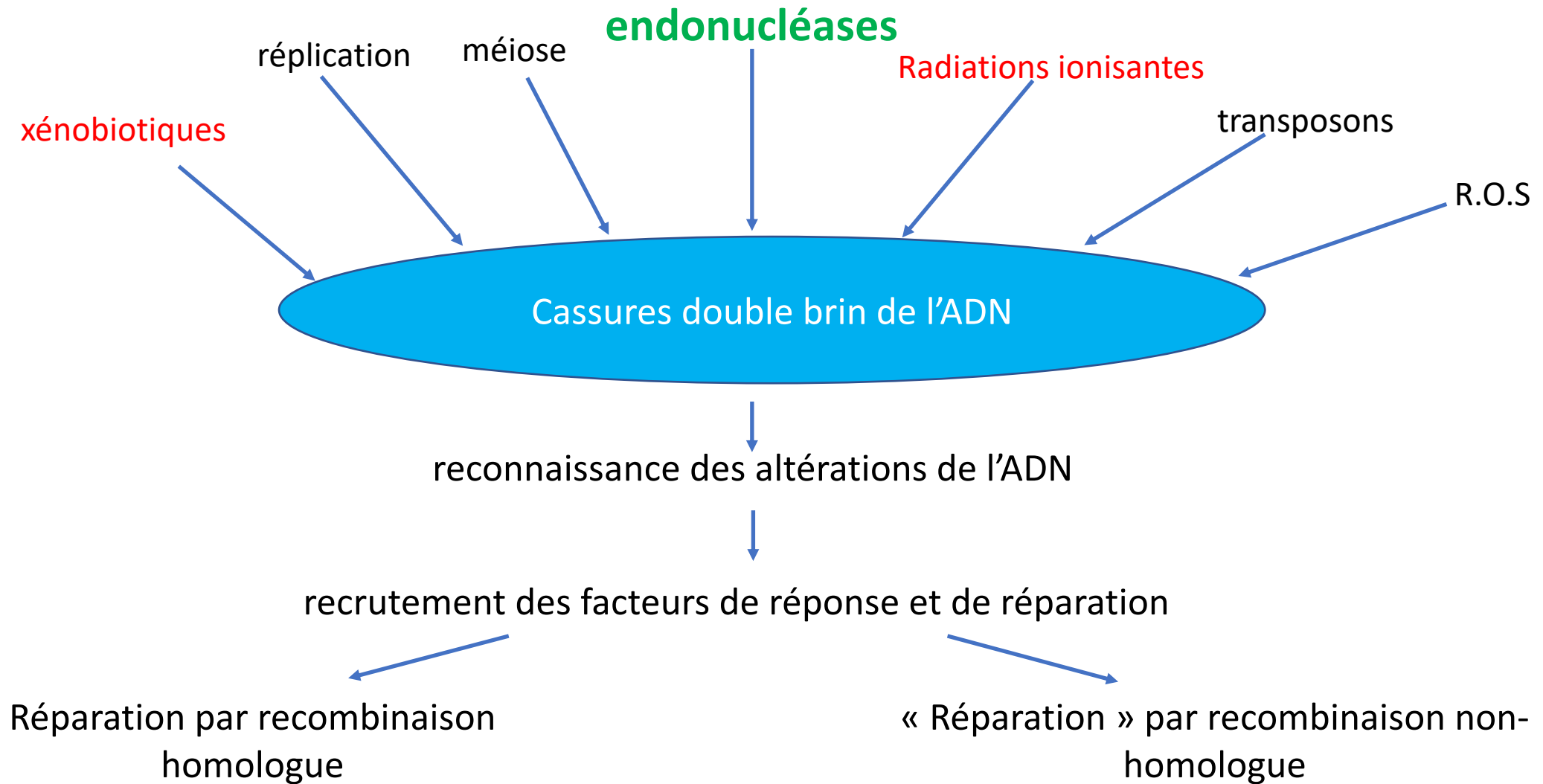
Parfois des évènements complexes



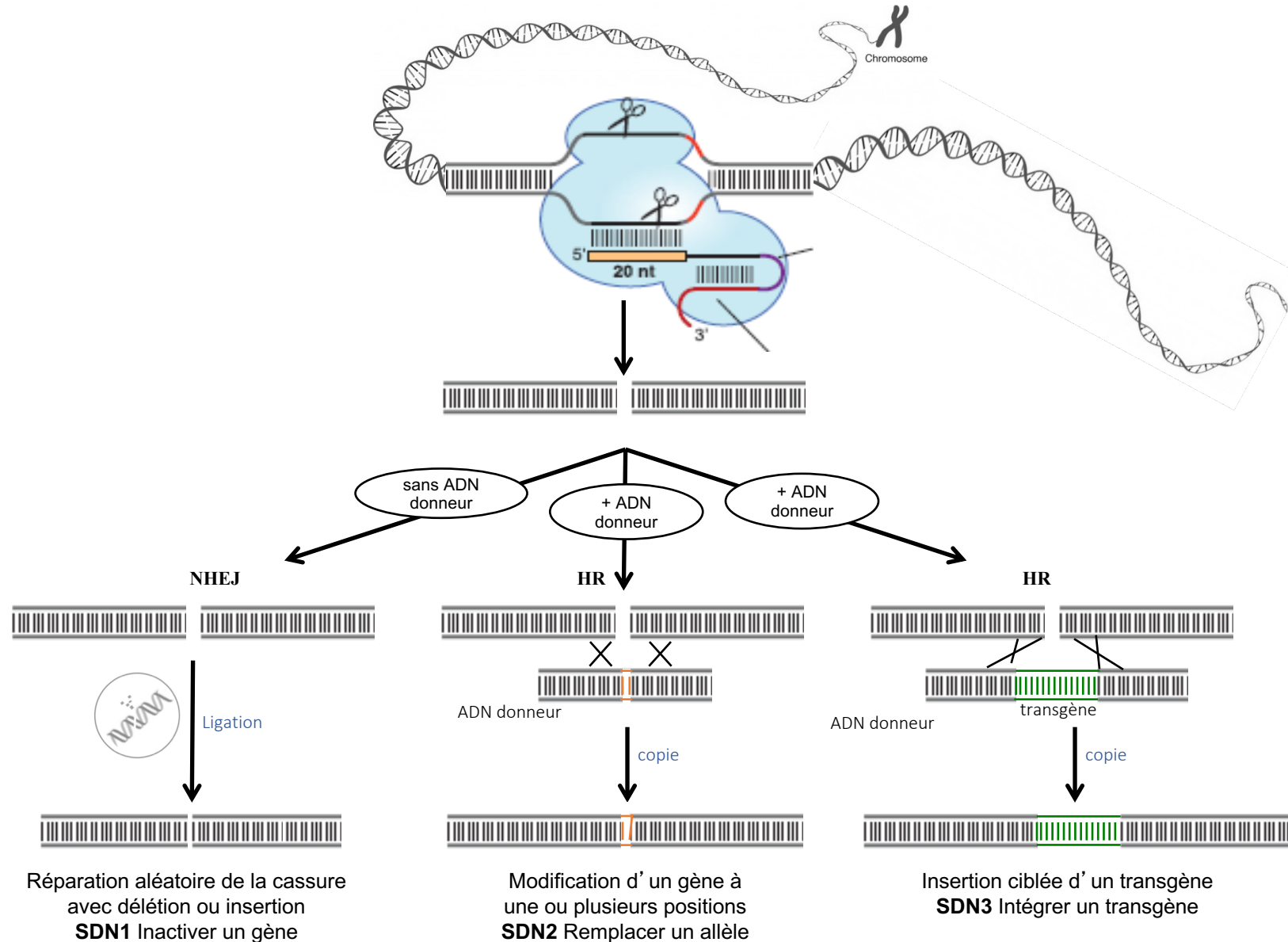
Chromothripsie

Pablo Carbonell-Bejerano et al.
 Plant Physiology, 2017, Vol. 175,
 pp. 786–801

Facteurs endogènes et **exogènes** induisant des cassures de l'ADN



Trois possibilités de « réécriture »



Les 3 types d'intervention conduisent à des résultats de natures différentes.

- SDN1 : est une forme de mutagénèse (provoque des mutations)
dont dérivent l'essentiel des résultats actuels
- SDN2 : est, au sens propre, une réécriture.
- SDN3 : est une forme élaborée de transgénèse.
- *Plus récent BE (Base editing) : est également une forme de mutagénèse par modification chimique d'une base à l'aide d'une protéine Cas sans activité nucléase à laquelle on a greffé une activité désaminase.*

Exemples d'utilisation de SDN1 (inactivation)

Blé tendre	MLO A1, B1, D1 GLIA ?	Résistance oïdium Réduction gluten Richesse en fibres
Cacao	TcNPR3	Résistance phytophthora
Cameline	FAD2	Richesse en acide oléique
Canne	COMT	Dégradation biomasse
Chou	GA4a	Taille réduite
Citrus	LOB1	Résistance au chancre
Concombre	eIF4E	Résistance potyvirus
Cotonnier	Gh14.3.3d	Résistance verticilliose
Orge	HvPM19	Dormance

Exemples d'utilisation de SDN1 (inactivation)

Maïs	ZmIPK	Réduction acide phytique
	Wx1	Amidon sans amylose
Manioc	eIF4E	Résistance aux potyvirus
Pomme de terre	GBSS	Amidon sans amylose
	Vinv	friture sans acrylamide
Riz	Os SWEET 11 et 14	Résistance bactériose
	OsERF922	Résistance pyriculariose
	REC8+PAIR1+OSD1+MTL	Apomixie
Soja	Drb2a et 2b	Tolérance sécheresse et sel
Sétaire	ID1	Floraison retardée
Tomate	MLO1	Résistance oïdium
	AGL6	Parthenocarpie
Vigne	MLO7	Résistance oïdium

D'autres applications

- Construire une collection de lignées mutantes pour chacun des gènes d'une espèce

(34234 gènes dans plus de 90000 lignées de riz)

Meng X, Yu H, Zhang Y, Zhuang F, Song X, et al. 2017. Construction of a genome-wide mutant library in rice using CRISPR/Cas9. *Mol. Plant* 10:1238–41

- Passer d'une espèce sauvage à une espèce cultivable par l'édition de 6 gènes (DOG1, FAE1, FAE2, HAG1, GTR2, DGAT) du tabouret des champs

Sedbrook JC, Phippen WB, Marks MD. 2014. New approaches to facilitate rapid domestication of a wild plant to an oilseed crop: example of pennycress (*Thlaspi arvense* L.). *Plant Sci.* 227:122–32



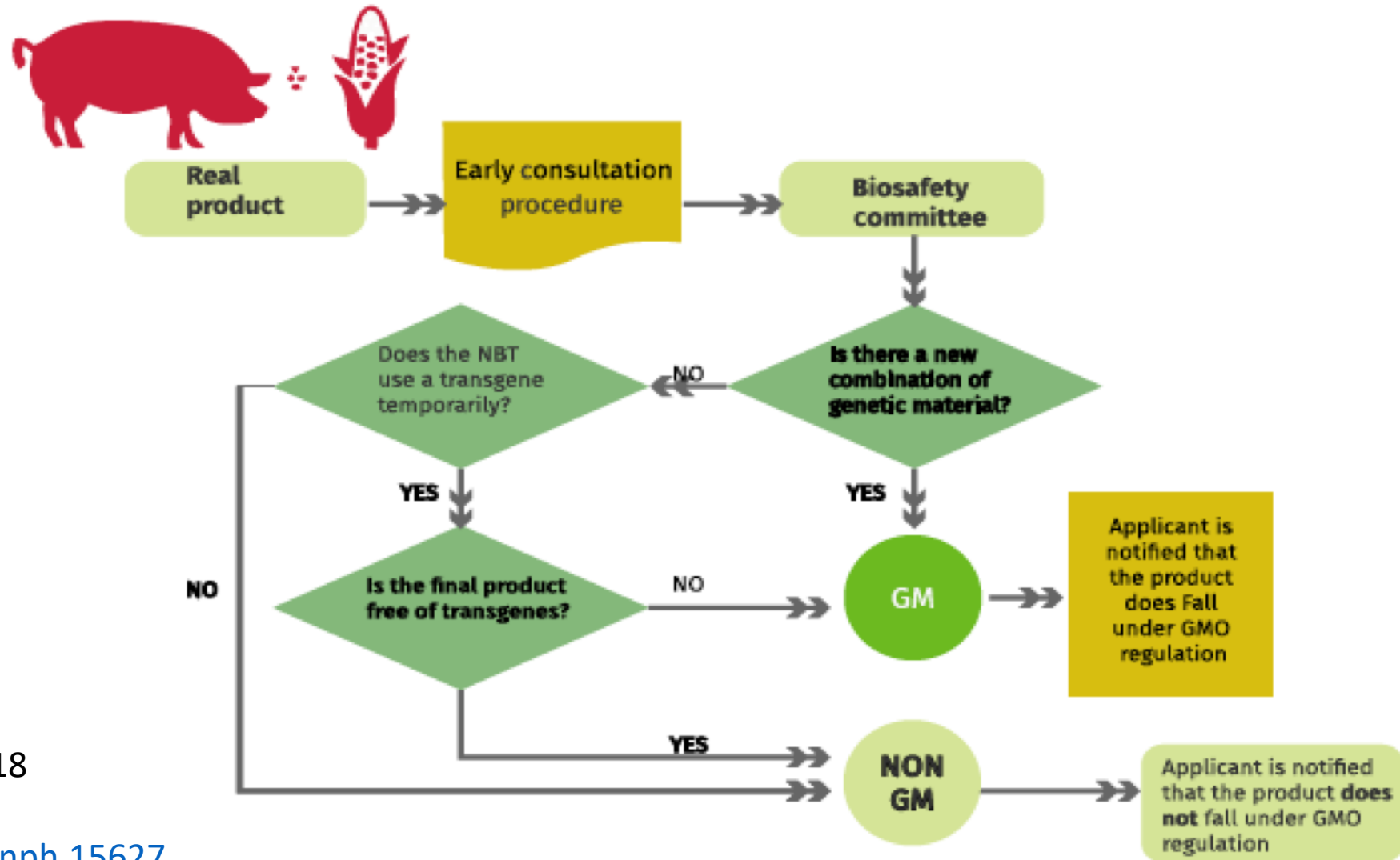
La mutagénèse, ciblée ou non, est aléatoire

- L'endonucléase Cas9, comme l'irradiation, déclenche des processus cellulaires de réparation de l'ADN.
- Le résultat recherché (irradiation ou SDN1) est une « erreur » de réparation.
- La « nature » de la mutation obtenue (le plus souvent une insertion ou une délétion de quelques paires de bases), ne dépend pas de la cause initiale.
- **Ce n'est pas la technique qui « façonne » le mutant !**

Pays qui ont approuvé pour commercialisation des produits de réécriture génomique « non OGM »

- Argentine: pomme de terre sans brunissement, soja haut oléique, soja HR,
- Brésil : bovins sans cornes, super levure (production d'éthanol)
- Canada : colza résistant aux sulfonilurées
- Chili : soja à faible teneur en acide linoléique, cameline riche en acide oléique
- Etats-Unis: soja tolérant la sécheresse, maïs waxy, cameline riche en huile, soja haut oléique, blé riche en fibres, blé résistant à l'oïdium, pomme de terre stockable au froid, pomme de terre sans brunissement, ...
- *D'autres pays, comme le Japon, n'ont pas encore approuvé de variétés mais ont précisé que les produits issus de réécriture ne seraient pas réglementés.*

Exemple de l'Argentine



Dennis Eriksson et al. 2018

New Phytologist

<https://doi.org/10.1111/nph.15627>

EN EUROPE ?

Quid du commerce international des produits agricoles?

Requête auprès du gouvernement

Confédération paysanne et huit associations de protection de l'environnement et d'informations sur les dangers des OGM

1. Abroger l'exclusion de **la mutagenèse des techniques conduisant à un OGM**
2. Interdire la culture et la commercialisation des variétés de colza rendues **tolérantes « aux herbicides »**, obtenues par mutagenèse.
3. Instaurer un moratoire sur les variétés de plantes rendues **tolérantes « aux herbicides »** obtenues par mutagenèse.

Echec



Conseil d'Etat le 12 mars 2015



Le Conseil d'Etat s'en remet à la CJUE le 17 octobre 2016

Cour de justice de l'Union européenne
COMMUNIQUE DE PRESSE n° 111/18
Luxembourg, le 25 juillet 2018

Les organismes obtenus par mutagenèse constituent des OGM et sont, en principe, soumis aux obligations prévues par la directive sur les OGM

Néanmoins, les organismes obtenus par des techniques de mutagenèse qui ont été traditionnellement utilisées pour diverses applications et dont la sécurité est avérée depuis longtemps sont exemptés de ces obligations, étant entendu que les États membres sont libres de les soumettre, dans le respect du droit de l'Union, aux obligations prévues par la directive ou à d'autres obligations

LE CONTEXTE

15 Pays européens et 4 « régions » interdisent la culture de PGM

- Autriche, Bulgarie, Croatie, Chypre, Danemark, France, Allemagne, Grèce, Hongrie, Italie, Lettonie, Lituanie, Pays-Bas, Pologne, Slovénie
- Ecosse, Irlande du nord, Pays de Galles, Wallonie

LE CONTEXTE



Réaction du gouvernement français



Nicolas HULOT,
ministre d'État,
ministre de la Transition écologique et solidaire

Bruno LE MAIRE,
ministre de l'Économie et des Finances

Stéphane TRAVERT,
ministre de l'Agriculture et de l'Alimentation

Frédérique VIDAL,
ministre de l'Enseignement supérieur,
de la Recherche et de l'innovation

Paris, le jeudi 26 juillet 2018

Communiqué de presse

**Le Gouvernement salue la clarification de la Cour de Justice
de l'Union Européenne sur le statut des nouvelles techniques de mutagenèse**

Le coup d'arrêt de l'Arrêt de la CJUE

- Les variétés dont le génome a été modifié en utilisant les technologies de réécriture seront soumises aux procédures d'évaluation des risques, d'autorisation, de traçabilité et d'étiquetage des OGM, même si aucun fragment d'ADN exogène n'a été introduit.
- L'arrêt de la CJUE génère la situation absurde où deux mutations strictement identiques, l'une issue de mutagenèse ciblée, l'autre spontanée ou provenant d'irradiation, seront règlementées différemment : la première créant un OGM, la seconde soumise aux seules règles de la sélection conventionnelle.
- Cet arrêt est fortement contesté par le Scientific Advice Mechanism, et l'European Plant Science Organisation : « Genetically and phenotypically similar plants obtained by more recent techniques are not expected to present significantly different risks than those produced by older techniques »

Conclusion

- Les méthodes de réécriture sont devenues incontournables en biologie (végétale).
- Une situation de blocage est créée par l'Arrêt de la CJUE de 2018.
- Cet Arrêt s'appuie sur des critères arbitraires et contraires aux réalités scientifiques.
- Délocalisation des projets (publics comme privés) hors Europe.
- Délocalisation des entreprises ?
- Quel futur pour la recherche en biologie végétale ?
- **Vers des amendements de la « directive OGM » et des règlements européens ?**