



NBTs et Techniques d'édition du génome : Impacts potentiels sur l'offre variétale et les activités du CTPS

Cette étude a été soutenue par le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, pour le compte du Comité Technique Permanent de la Sélection des plantes cultivées (CTPS)

Mélodie Gendre

Novembre 2016

DEFINITIONS

Allèle : Version d'un gène ou d'un locus.

Allogamie : Fécondation entre deux individus distincts.

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

Autogamie : Fécondation des gamètes femelles par les gamètes mâles issues du même individu.

Backcross (=rétrocroisement) : Croisement d'un hybride avec une plante de génotype parental.

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.

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

Endophyte : Organismes qui accomplissent tout ou une partie de leur cycle de vie dans une plante de manière symbiotique.

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

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

Germinal : Relatif aux cellules reproductrices.

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.

Intragène : Séquence génique réarrangée *in vitro* dont chacun des composants provient de la même espèce ou d'une espèce sexuellement compatible à l'organisme receveur.

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

Locus : Emplacement physique invariable sur un chromosome.

Nucléase : Enzyme capable de cliver les liaisons phosphodiester des séquences d'acides nucléiques.

Plasmide : Molécule d'ADN circulaire non essentielle à la survie de la cellule.

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

Pluripotence : Faculté d'une cellule à se dédifférenciée.

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

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

CGAAER : Conseil Général de l'Alimentation, de l'Agriculture et des Espaces Ruraux

CMS : *Cytoplasmic Male sterility* ou "Stérilité male cytoplasmique"

CTPS : Comité Technique Permanent de la Sélection

CRISPR/Cas : *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats* ou "courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées" / *CRISPR associated protein 9* ou "protéine 9 associée à CRISPR"

DHS : Distinction, Homogénéité, Stabilité

DSB : *Double-Strand Break* ou "Cassure double brin"

EMS : Méthanesulfonate d'éthylène

GEVES : Groupes d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences

HCB : Haut Conseil des Biotechnologies

HR : *Homologous Recombination* ou "Recombinaison Homologue"

NHEJ : *Non Homologous End-Joining* ou "Jonction des extrémités non-homologues"

N(P)BT : *New (Plant) Breeding Techniques* ou "Nouvelles techniques de selection (des plantes)"

ODM : *Oligonucleotide directed mutagenesis* ou "Mutagénèse dirigée par oligonucléotide"

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

POC : *Proof Of Concept* ou "Preuve de concept"

QTL : *Quantitative Traits Locus* ou "Locus de caractères quantitatifs"

RdDM : *RNA depend-DNA Methylation* ou "Méthylation de l'ADN assistée par ARN"

RNAi : *RNA interference* ou "ARN interférence"

SDN : *Site Directed Nuclease* ou "Nucléase dirigée"

TALEN : *Transcription activator-like effector nucleases* ou "nucléases effectrices de type activateur de transcription"

Tilling : *Targeting Induced Local Lesions in Genomes* ou “Lésion locale provoquée dans le génome”

VATE : Valeur Agronomique, Technologique et Environnementale

ZFN : *Zinc Finger Nucleases* ou “Nucléase en doigt de zinc”

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
1 Méthodologie et généralités sur les NBTs et techniques d'édition du génome	3
1.1 Méthodologie mise en œuvre dans l'étude	3
1.2 Les différentes N(P)BT	4
2 Les techniques d'édition du génome : SDN/ODM.....	12
2.1 Mécanismes de réparation de l'ADN	13
2.2 Mode d'action et types d'applications possibles en biologie des plantes	14
2.3 Parallèle avec d'autres techniques de création variétale	17
2.4 Utilisations des SDNs en amélioration des plantes en dehors de l'édition du génome au sens strict.....	20
3 Utilisation en création variétale et dans la filière végétale : exemples et limites	23
3.1 Utilisation en création variétale	23
3.2 Modification d'autres organismes biologiques de la filière végétale	25
3.3 Limites dans l'utilisation des techniques d'édition du génome	26
4 Incidence de l'utilisation des techniques d'édition du génome sur l'innovation variétale	28
4.1 Incidence sur les caractères des plantes éditées	29
4.1.1 Les espèces travaillées	29
4.1.2 Les traits modifiés.....	30
4.1.3 Structures génétiques des futures variétés.....	36
4.2 Vision des professionnels de la semence	38
4.2.1 Les espoirs et les craintes des différents acteurs sur l'édition du génome.....	38
4.2.2 Mise en place des techniques.....	42
4.2.3 Modification des schémas de sélection.....	43
4.3 Impact sur l'utilisation des ressources génétiques.....	44
4.4 Types variétaux et éditions du génome.....	45
4.5 Incidence sur les collaborations entre acteurs de la filière.....	46
4.5.1 Partenariats de recherche	47

4.5.2	Ouverture du marché à de nouveaux acteurs.....	49
5	Impacts de l'utilisation des techniques d'édition du génome sur le CTPS.....	50
5.1	Rappel du rôle du CTPS.....	50
5.2	Impacts sur les évaluations DHS et VATE.....	51
5.3	Modification des stratégies d'évaluation	52
5.4	Impacts du changement des processus de sélection	55
5.5	Changements des démarches évaluatives	56
5.6	Non déclaration des éditions lors de l'inscription	57
	CONCLUSION.....	60
	BIBLIOGRAPHIE	62
	WEBOGRAPHIE ET AUTRES REFERENCES.....	72
	ANNEXES.....	73

INTRODUCTION GENERALE

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 ») dont l'inclusion ou non dans le champ d'application de la directive européenne 2001/18/CE (*Directive 2001/18/CE du Parlement européen et du Conseil du 12 mars 2001 relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement et abrogeant la directive 90/220/CEE du Conseil - Déclaration de la Commission* 2016) du 12 mars 2001, relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement, n'est à l'heure actuelle pas encore défini (Lusser et al., 2011; Lusser et Davies 2013).

Dans le cadre de la mise en œuvre de la feuille de route du CTPS (Comité Technique Permanent de la Sélection) incluse dans le plan Semences et Plants pour une Agriculture Durable (voir « Le plan d'action « Semences et agriculture durable » | Alim'agri » 2016; « Évaluation du plan semences et agriculture durables » 2016), le comité scientifique du CTPS a mené une étude sur ces nouvelles techniques de sélection des plantes, et notamment des techniques d'édition du génome afin de répondre à deux problématiques majeures :

- 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 ?

Ce travail au sein du CTPS a été réalisé en parallèle d'une étude par le Haut Conseil des Biotechnologies (HCB) visant à éclairer le Gouvernement français pour lui permettre d'établir la position française en terme de réglementation de ces nouvelles techniques de sélection des plantes, ainsi qu'en parallèle d'une étude du Conseil Général de l'Alimentation, de l'Agriculture et des Espaces Ruraux (CGAAER) sur les aspects de propriété intellectuelle liés à ces techniques. Du fait de ces deux études parallèles, ce travail au sein du CTPS ne traitera pas de ces deux problématiques annexes.

Ce rapport présente les conclusions de l'étude réalisée par le CTPS, sur l'incidence potentielle des techniques d'édition du génome sur l'offre variétale et sur les activités du CTPS. Dans une première partie, la méthodologie employée pour conduire cette étude est décrite, et les NBTs et techniques d'édition du génome sont présentées. La deuxième partie du rapport présente le mode d'action des techniques d'édition du génome, et les types d'applications possibles en biologie des plantes. Dans la suite du rapport, des utilisations possibles de ces techniques en amélioration des plantes sont présentées, puis l'incidence potentielle de l'utilisation de ces techniques sur l'innovation variétale, et sur les missions du CTPS sont discutées.

1 Méthodologie et généralités sur les NBTs et techniques d'édition du génome

1.1 Méthodologie mise en œuvre dans l'étude

Les informations recueillies pour la rédaction de ce rapport proviennent de plusieurs sources : d'une analyse des données bibliographiques et des bases brevets, d'un séminaire interne organisé au siège du GEVES à Beaucozéz les 12 et 13 juillet 2016 rassemblant les membres du comité scientifique du CTPS et des intervenants extérieurs, d'une lecture des documents de positionnement des différentes institutions françaises et étrangères ainsi que d'une série d'interviews avec différents acteurs de la filière semences et plants (ANNEXE 1).

Ce travail s'est essentiellement focalisé sur les techniques NBTs dites d'édition du génome permettant une modification induite et ciblée des séquences nucléotidiques. En effet, parmi la liste des NBTs proposée par la Commission Européenne, celle faisant intervenir les nucléases dirigées est de loin la plus étudiée d'un point de vue académique et semble la technique ayant le plus d'avenir d'un point de vue appliquée dans les processus de sélection (figure 1).

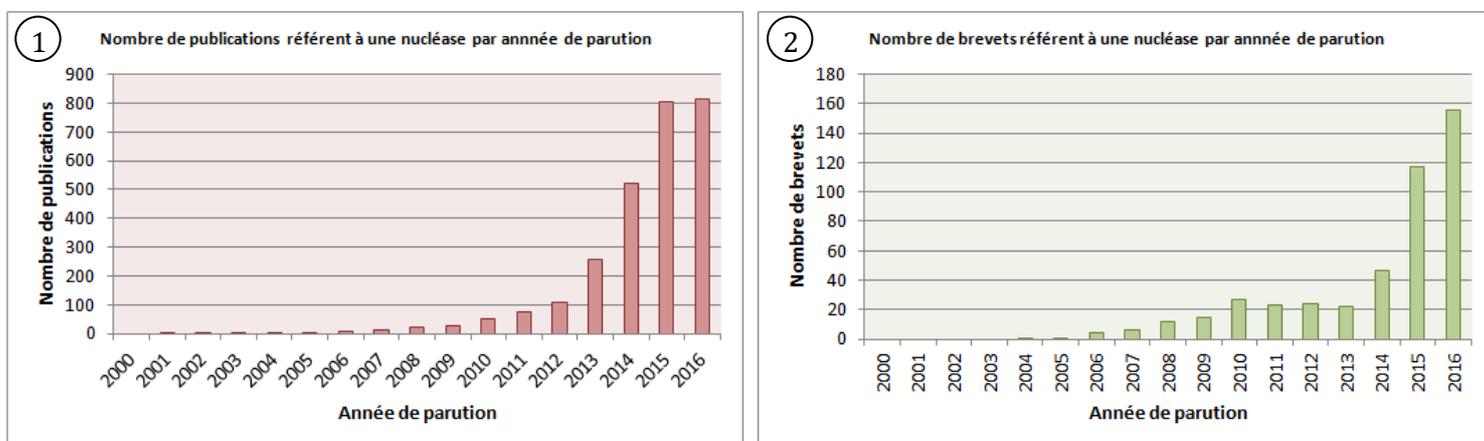


Figure 1 Evolution du nombre 1) de publications 2) et de brevets citant une ou des nucléases dirigées dans leur titre. Le nombre de publications et de brevets dont le titre comprend le nom d'au moins une nucléase dirigée est en croissance exponentielle depuis les années 2000, 2012 marque la découverte de la technique d'édition des génomes fondée sur le système CRISPR/Cas9. Les graphiques ont été extraits le 24 octobre 2016, les données de l'année 2016 sont donc incomplètes.

1.2 Les différentes N(P)BT

L'ensemble des huit techniques de sélection des plantes 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.

Ces huit techniques sont les suivantes :

- La cisgénèse / Intragénèse
- Le greffage sur porte-greffe transgénique
- L'agro-infiltration
- La méthylation de l'ADN assistée par ARN (ou « RdDM » selon l'acronyme anglais « RNA-dependent DNA methylation »)
- La sélection inverse
- La génomique de synthèse
- La mutagenèse dirigée par oligonucléotides (ou « ODM » selon l'acronyme anglais de « Oligonucleotide Directed Mutagenesis »)
- Les nucléases dirigées (ou « SDN » selon l'acronyme anglais « Site Directed Nuclease »)

Le principe de chacune de ces NBT sera ici brièvement décrit, pour plus de précisions, se référer à l'ANNEXE 2 composée des « Fiches nouvelles techniques » tirées du rapport de première réflexion du HCB sur les NBTs (Haut Conseil des Biotechnologies 2016).

∴ Cisgénèse et intragénèse

Les techniques de cisgénèse et d'intragénèse font référence à la transformation génétique d'une plante par des séquences nucléotidiques provenant exclusivement de plantes issues de la même espèce ou d'espèces sexuellement compatibles (Shouten et Jacobsen, 2008 ; Holme et al., 2013).

Les séquences cisgéniques ou intragéniques sont insérées aléatoirement et stablement dans le génome de l'organisme receveur. Les modifications génétiques seront alors transmises à la descendance.

- Cisgénèse

Dans le cas de la cisgénèse, les gènes ou les séquences géniques issus de plantes de la même espèce sont apportés de manière fonctionnelle, sans réarrangement de séquence, avec l'ensemble de leurs séquences régulatrices et de leurs introns (Schouten et al., 2006).

La séquence cisgénique peut être insérée au même locus que sa position initiale dans l'espèce compatible, ou ailleurs dans le génome de la plante receveuse.

- Intragénèse

Dans le cas de l'intragénèse, les gènes ou les séquences géniques sont apportés sous forme tronquée ou réarrangée *in vitro*. Les séquences régulatrices et les introns ne sont pas nécessairement ceux initialement associés au gène, mais chacun des éléments provient de génomes de plantes de la même espèce, ou d'espèces sexuellement compatibles (Rommens, 2004).

La séquence intragénique peut être insérée au même locus que sa position initiale dans l'espèce compatible, ou ailleurs dans le génome.

∴ Grefe sur porte-grefe transgénique

La technique de greffage végétal désigne le fait de combiner les tissus d'une plante enracinée (le porte-grefe) avec un greffon ou un bourgeon provenant d'une autre plante, de la même espèce ou d'espèce différente, en les liant par leurs vaisseaux cribro-vasculaires.

Le greffage entre dans le cadre des techniques dites NBT dans le cas où le porte-grefe est transgénique, mais pas les parties aériennes greffées.

Le greffon non transgénique se développe ainsi sur le système racinaire du porte greffe transgénique, induisant des échanges réciproques de molécules (protéines, peptides, régulateurs de transcription, solutés par exemple), tout en préservant les génomes des deux composantes de la greffe. Cette technique peut être utilisée en amélioration des plantes arboricoles, horticoles et viticoles afin d'augmenter les qualités agronomiques du greffon (vigueur, productivité, précocité, résistances aux stress biotiques et abiotiques par exemple) (Haroldsen et al., 2012; Smolka et al., 2010).

Les parties aériennes de la plante ainsi créée, y compris les fleurs, fruits et graines, sont dépourvues de transgène, celui-ci ne pourra donc pas être transmis à la descendance.

∴ Agro-infiltration

La technique d'agro-infiltration des tissus non reproducteurs, parce qu'elle offre un moyen rapide d'atteindre un niveau d'expression génique fort dans une zone définie et distincte, est utilisée en recherche appliquée pour induire des phénomènes de RNA silencing (Schöb, Kunz, et Meins 1997) et d'agroinfection notamment pour le criblage de phénomènes de résistance et de sensibilité (Grimsley et al., 1986). Les plantules présentant après agro-infiltration le phénotype souhaité sont sélectionnées pour être utilisées comme parents dans les schémas de sélection classique (Chen et al., 2013).

Les Agrobactéries sont les vecteurs de cette agro-infiltration ; ce sont des bactéries qui possèdent naturellement la capacité de transmettre au génome des cellules végétales une portion de leur plasmide située entre les bordures droites et gauches.

Dans le cas des NBTs, l'agro-infiltration est localisée dans les tissus végétatifs de la plante, le transgène ne pourra donc pas être transmis à la descendance de la plante agroinfiltrée.

∴ Méthylation de l'ADN assistée par ARN (RdDM)

La méthylation de l'ADN assistée par ARN permet la modification épigénétique de portions ciblées du génome afin de moduler l'expression de gènes sans agir sur la séquence nucléotidique en elle-même. Les mécanismes cellulaires impliqués dans ces modifications épigénétiques par RdDM ne sont pas totalement élucidés, mais il est cependant accepté que cette technique soit basée sur l'action de longs ARNs double brin (DsRNA), spécifiques à la région ciblée, insérés ou produits dans la cellule végétale. Ces DsRNAs sont pris en charge par des enzymes végétales et dégradés en petits ARNs interférents méthylés (SiRNAs) qui par homologie de séquence s'hybrideront à la cible ce qui permettra de recruter une ADN méthyltransferase qui catalysera la méthylation des cytosines au niveau de la séquence ADN cible (Figure 2) (Matzke et Mosher, 2014).

Ces modulations épigénétiques pourront être transmises à la descendance sur un nombre variable de générations (Weigel et Colot, 2012; Schmitz et Ecker, 2012).

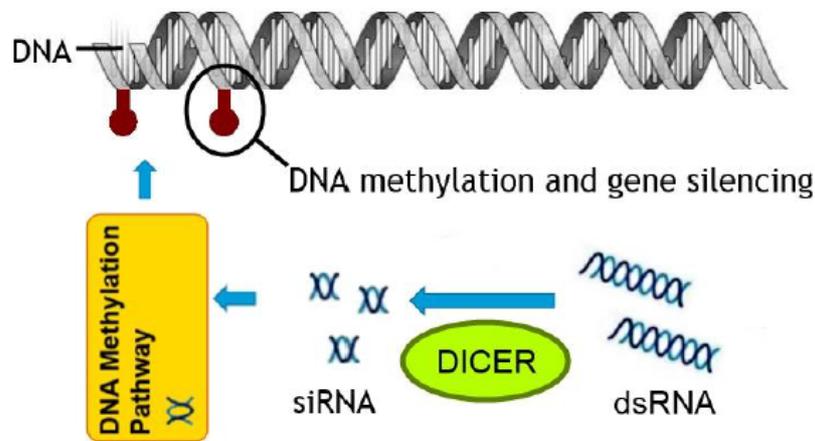


Figure 2 Schéma général de la stratégie de méthylation de l'ADN par RdDM (d'après nbtplatform.org). Les ARNs double brin (DsRNA) spécifiques à la région cible à méthyler sont pris en charge par les protéines végétales de type Dicer afin d'être dégradés en petits ARNs interférents méthylés (SiRNAs), qui par homologie de séquence et guides par les enzymes végétales vont transférer leur groupement méthyl à la molécule d'ADN.

∴ Génétique inverse

La technique NBT de génétique inverse permet de reconstruire des lignées parentales homozygotes à partir d'une plante hétérozygote (pouvant être un hybride)(Chan, 2010).

Pour ce faire, les gènes responsables de la recombinaison méiotique sont inactivés par ARN interférence, les microspores haploïdes ainsi obtenues sont soumises à un doublement de leur génome par la colchicine. Ces cellules désormais diploïdes peuvent être régénérées par Culture *In Vitro* afin de produire des plantes fertiles, diploïdes et complètement homozygotes (Figure 3) (Dirks et al., 2009; Wijnker et al., 2012).

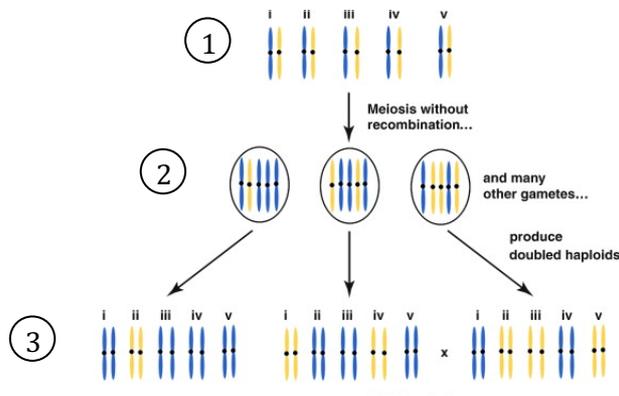


Figure 3 Schéma général de la technique de génétique inverse (d'après Chan 2010). 1) La recombinaison méiotique cellulaire est inhibée afin d'induire 2) la formation de microspores haploïdes. 3) Le génome des microspores haploïdes est ensuite doublé chimiquement afin de former des cellules diploïdes et homozygotes.

Génomique de synthèse

La génomique de synthèse permet de définir et de créer des éléments biologiques, des fonctions ou des organismes non présents dans la diversité biologique. La génomique de synthèse permet également de modifier des éléments biologiques et des systèmes préexistants afin de leur attribuer de nouvelles fonctions (Konig et al., 2013)

L'ensemble des modifications créées par génomique de synthèse dans le génome de la plante pourra être transmis à la descendance.

∴ Mutagenèse dirigée par oligonucléotide (ODM)

La mutagenèse dirigée par oligonucléotide permet la modification précise et choisie d'une ou de quelques paires de bases du génome de la plante.

Pour créer la mutation, un oligonucléotide de 20 à 100pb est inséré en quantité suffisante dans la cellule afin de maximiser les chances de mise en contact et d'hybridation de la séquence cible et de l'oligonucléotide. Cet oligonucléotide est homologue à la séquence cible, mais porte les modifications voulues à « recopier » dans le génome.

Par hybridation des séquences homologues entre l'oligonucléotide et la séquence cible, les mécanismes de réparation de l'ADN vont s'enclencher pour corriger les mésappariements créés en prenant l'oligonucléotide comme matrice modèle, procédant ainsi à la modification génétique souhaitée au niveau de la cellule végétale (Igoucheva et al., 2004) (Figure 4).

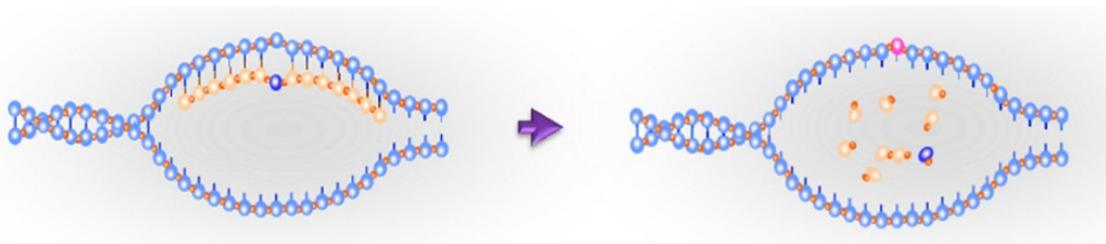


Figure 4 Schéma de la technique d'édition du génome par ODM (Image Keygene). L'oligonucléotide s'hybride au niveau d'une séquence cible homologue, créant un mésappariement au niveau de la/des bases à modifier. Après détection du mésappariement, les mécanismes de réparation de l'ADN vont procéder à la réparation de cette anomalie en prenant comme modèle l'oligonucléotide hybridé. L'oligonucléotide est ensuite dégradé.

L'ensemble des mutations créées par ODM dans le génome de la plante pourront être transmises à la descendance.

∴ Nucléase dirigée

La dernière NBT citée, et la plus étudiée, 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 afin de créer une mutation non prédéfinie (insertions ou délétions) au point de coupure ou bien afin de modifier précisément l'ADN par l'insertion spécifique d'une matrice ADN.

A l'heure actuelle, quatre familles de nucléases dirigées sont ou ont été utilisées dans les laboratoires de recherche (Kim et Kim 2014): Les méganucléases, les ZFNs (Petolino 2015) les TALENs et les nucléases de type CRISPR/Cas9.

L'ensemble des mutations créées par les nucléases dirigées dans le génome de la plante pourront être transmises à la descendance.

- Méganucléases

Le premier type de nucléase découverte représente la famille des méganucléases. Ces méganucléases sont un ensemble d'enzymes de type endonucléase nécessitant un site de reconnaissance de 12 à 30pb sur l'ADN pour effectuer la coupure (Stoddard, 2005). Elles sont naturellement présentes chez différents organismes vivants (bactéries, levures, algues, organelles par exemple). Leur diversité naturelle n'est cependant pas suffisante pour permettre le ciblage de toutes les parties du génome bien qu'il soit possible d'obtenir des méganucléases artificielles en induisant des variations peptidiques sur les enzymes naturelles.

Les méganucléases sont le premier type de SDN identifiées pour l'édition du génome et sont désormais peu utilisées. En général, ces méganucléases sont produites afin de reconnaître des séquences spécifiques incluses dans des transgènes, comme par exemple le site I-SceI, afin de réaliser du pyramidage de gènes ou de l'excision de marqueurs de sélection.

- Nucléases à doigt de zinc (ZFNs)

Les ZFNs (de l'acronyme anglais « Zing Finger Nucleases ») quant à elles sont des nucléases artificielles issues de la fusion d'une endonucléase non spécifique en général de type Fok1 avec un domaine de reconnaissance et de liaison à l'ADN en doigts de zinc. Ce domaine de reconnaissance est formé d'un enchainement de plusieurs domaines en doigts de Zinc, chacun reconnaissant spécifiquement 3 bases d'ADN (Le Provost et al., 2010; Gaj et al., 2013; Urnov et al., 2010).

Afin de couper l'ADN cible, l'enzyme Fok1 doit être dimérisée et deux ZFNs, sont donc nécessaires pour cliver de manière ciblée la double hélice d'ADN, chacun hybridé de manière concomitante sur les deux brins d'ADN complémentaires (Figure 5).

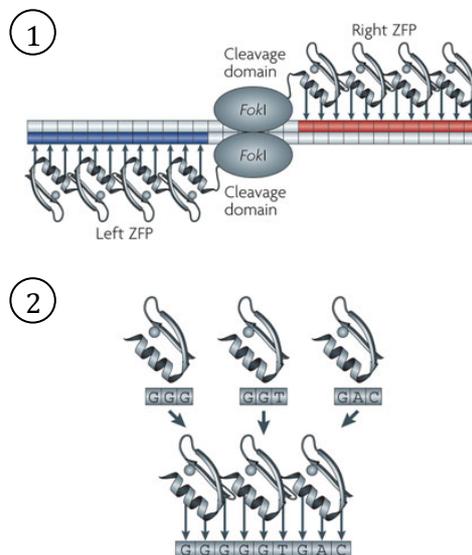


Figure 5 Organisation moléculaire des nucléases de type ZFN (d'après Urnov et al., 2010). 1) Organisation en dimères des nucléases de type ZFN formées chacune d'un domaine en doigt de zinc de reconnaissance à l'ADN et d'une nucléase de type Fok1. 2) Chaque doigt de zinc reconnaît spécifiquement un enchainement de 3 acides aminés et l'enchainement de plusieurs doigts de zinc créé la spécificité de l'enzyme.

- TALENs

Les TALENs (de l'acronyme anglais « Transcription Activator-Like Effector Nuclease ») sont-elles des nucléases artificielles issues de la fusion d'une endonucléase non spécifique de type Fok1 avec un domaine de reconnaissance et de liaison à l'ADN formé de la répétition d'une séquence de 30 à 35 acides aminés, répétée 12 à 27 fois en tandem. La spécificité du ciblage dépend de la variabilité de deux acides aminés en position 12 et 13 de chaque séquence répétée (Chen et Gao, 2013; Osakabe et Osakabe, 2015; Gaj et al., 2013).

Afin de couper l'ADN cible, l'enzyme FokI doit être dimérisée et deux TALENs, sont donc nécessaires pour cliver de manière ciblée la double hélice d'ADN, chacun hybridé de manière concomitante sur les deux brins d'ADN complémentaires (Figure 6).

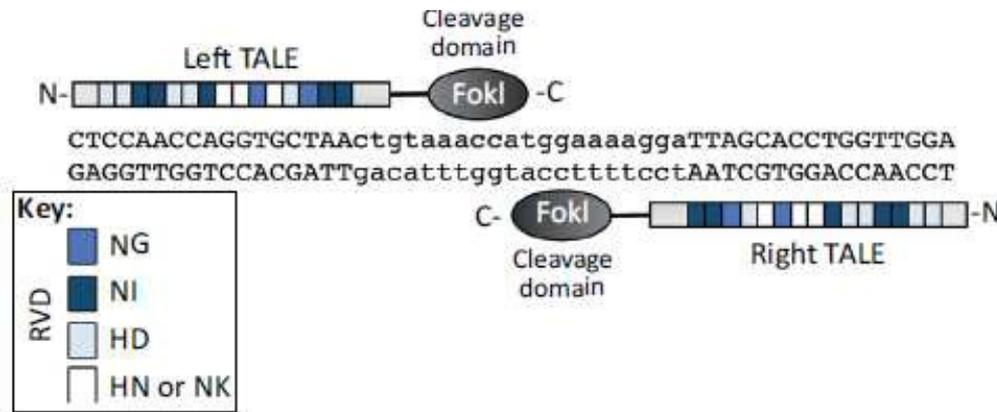


Figure 6 Organisation moléculaire des nucléases de type TALEN (d'après Gaj et al., 2013). Organisation en dimères des nucléases de type TALEN formées chacune d'un bras de séquences répétées qui créent la spécificité de l'enzyme pour la séquence cible associé à une nucléase de type FokI.

- 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 et 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 et al., 2015; Raitskin et Patron, 2016) ce qui était impossible avec les technologies précédentes.

Ces nucléases de type CRISPR/Cas9 sont des enzymes naturelles du système immunitaire bactérien pour combattre les infections virales. Elles sont composées d'une nucléase protéique de type Cas9 et d'un guide ARN. L'expression du locus CRISP formé d'une partie de la séquence d'ADN cible et de motifs ADN spécifiques au CRISP, permet la production de crRNA. Ces crRNA s'associent à un tracrRNA afin de former la séquence d'ARN guide. La protéine endonucléasique

Cas9 reconnaît ce complexe et s'associe avec ce guide pour former la SDN active spécifique de la cible (Figure 7) (Jinek et al., 2012).

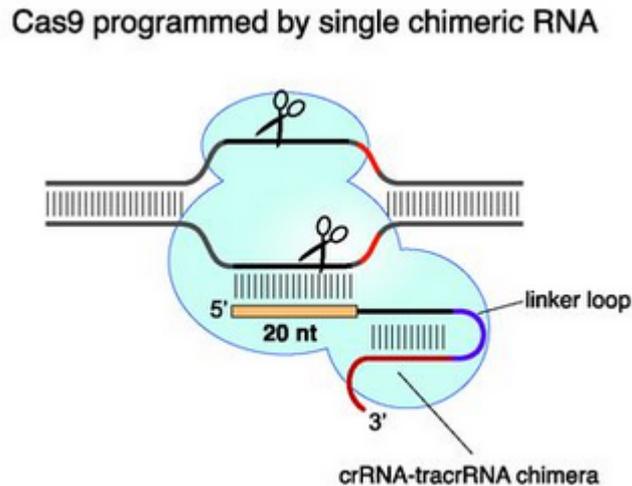


Figure 7 Organisation moléculaire des nucléases de type CRISPR/Cas9 (d'après Jinek et al., 2012). Organisation en monomère des nucléases de type CRISPR/Cas9. Le crRNA est associé au tracrRNA pour reconnaître spécifiquement l'ADN cible. La nucléase protéique Cas9 s'associe à ce complexe crRNA-tracrRNA et induira la coupure de l'ADN au niveau de la séquence cible.

2 Les techniques d'édition du génome : SDN/ODM

Parmi les huit NBTs, les techniques de mutagenèse dirigée par oligonucléotide (ODM) et de nucléases dirigées (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 et al., 2016) par la création de modifications dans la séquence nucléotidique de l'ADN au niveau de cibles prédéterminées et choisies pouvant être ou non une séquence génique (Swinnen et al., 2016; Quétier 2016).

L'ensemble des techniques de création variétale par édition du génome reposent sur les mécanismes naturels de réparation de l'ADN mis en œuvre par la plante en cas de dommage ou d'anomalie sur la séquence nucléotidique.

2.1 Mécanismes de réparation de l'ADN

L'ADN des organismes vivants est soumis en permanence à des lésions (Manova et Gruszka, 2015), soit 7×10^{-9} mutations par génération cellulaire pour la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Ossowski et al., 2010). Ces lésions de l'ADN étant extrêmement délétères pour la survie de l'organisme affecté, les cellules possèdent un ensemble de processus biologiques permettant de détecter, signaler et corriger ces lésions pour protéger l'intégrité du génome et son bon fonctionnement (Britt, 1996).

Parmi la panoplie de mécanismes naturels de réparation de l'ADN que les cellules végétales ont la capacité d'activer en cas de lésion, trois sont exploités par les techniques d'édition du génome dans l'objectif de créer une modification de séquence :

- Mécanisme de Jonction des extrémités non homologues

Le mécanisme de réparation de l'ADN par jonction des extrémités non-homologues (ou « NHEJ » selon l'acronyme Anglais « Non-Homologous End-Joining ») est le mécanisme de réparation majoritaire suite à une cassure double brin (ou « DSB » selon l'acronyme Anglais « Double Strand Break ») dans l'ADN des cellules végétales.

Suite à la détection de la DSB, les mécanismes de réparation de l'ADN vont être activés et procéderont au rattachement bout à bout des deux extrémités libre d'ADN, sans contrôle de conformité de la réparation (Davis et Chen, 2013).

Ce mécanisme de NHEJ est en général peu ou pas conservatif et lors de la coupure de l'ADN par la nucléase ou lors du rabouement des deux extrémités libres, il y a création d'une mutation aléatoire au point de coupure.

- Mécanisme de Recombinaison homologue

Le mécanisme de réparation de l'ADN par recombinaison homologue (ou « HR » selon l'acronyme Anglais « Homologous Recombination ») est minoritaire dans les cellules végétales face aux mécanismes de NHEJ, mais peut être favorisé par la création d'une cassure double brin de l'ADN au niveau de la séquence cible (Puchta et al., 1993) ou en agissant sur les gènes impliqués dans les processus de RH (Qi et al., 2013; Belhaj et al., 2013).

Suite à l'hybridation de deux séquences nucléotidiques homologues, les mécanismes de réparation de l'ADN vont s'enclencher et procéder à la réparation, ou la modification de la séquence d'ADN lésée en prenant le brin d'ADN non lésé pour matrice de réparation.

Ce mécanisme de RH est très conservatif, et procède donc à une réparation parfaite de la séquence nucléotidique.

- Mécanisme de Réparation des mésappariements

Un mésappariement entre les deux brins complémentaires de l'ADN est considéré comme une erreur par les mécanismes de contrôle de l'intégrité de l'ADN. La détection de cette anomalie activera les mécanismes de réparation des mésappariements qui remplacera les bases mésappariées sur l'un des brins d'ADN en recopiant le brin complémentaire selon les mêmes mécanismes que lors d'une réparation par RH (Li, 2008; Waterworth et al., 2011).

Ce mécanisme de réparation de l'ADN par réparation des mésappariements est très conservatif, et procède donc à une réparation ou une modification parfaite de la séquence nucléotidique.

2.2 Mode d'action et types d'applications possibles en biologie des plantes

Cette possibilité d'induire des modifications nucléotidiques de manière contrôlée et ciblée sur l'ADN font des techniques d'édition un outil désormais omniprésent dans les laboratoires de recherche travaillant sur les génomes, que ce soit en biologie humaine, animale, fongique, microbienne ou végétale.

Selon l'objectif final souhaité de l'édition, la présence ou non de matrice homologue ainsi que des mécanismes de réparation de l'ADN mis en jeu, trois types de modifications SDNs peuvent être décrits. Chaque type de modification SDN permet des actions particulières sur l'ADN cible.

∴ SDN1

Les éditions du génome de type SDN1 sont des mutations non prédéfinies de l'ADN en un site choisi. Les 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.

- Modification de l'expression des gènes

L'édition du génome de type SDN1 est principalement utilisée pour créer des mutations aléatoires au point de coupure de la nucléase dirigée. Cette modification de type SDN1 entraîne dans la majorité des cas l'extinction (ou « KO » selon l'acronyme anglais « Knock Out ») du gène ou de la séquence régulatrice ciblée et dans de rares cas, le nouvel allèle créé par la modification SDN1 peut au contraire activer (ou « KI » selon l'acronyme anglais « Knock In ») ou moduler le gène ou la séquence régulatrice cible de la nucléase.

- Réarrangement chromosomique et création de séquences chimériques

Les éditions du génome de type SDN1 peuvent également induire la création de modifications beaucoup plus complexes au niveau de la séquence génomique cible, pouvant conduire à des réarrangements chromosomiques ou encore à la création de séquences chimériques (Kraft et al., 2015).

-Excision de gènes : Deux coupures de l'ADN de type SDN1 peuvent être provoquées simultanément au niveau de cibles proches, leur coupure concomitante de la double hélice d'ADN pourra alors provoquer l'excision et la libération de la portion d'ADN située entre les deux sites de coupure (Zhou et al., 2014).

-Réintégration ou inversion de séquence : La portion génique excisée après la création de coupures proches et simultanées peut être réintégrée de manière aléatoire au niveau du site de coupure. La portion génique pourra être réintégrée de manière identique ou de manière inversée (Choi et Meyerson, 2014) conduisant à la formation de séquences chimériques. Il est également possible qu'une séquence d'ADN libre présente dans le génome de la plante soit

intégrée par ces mécanismes, les différentes extrémités libres des brins d'ADN n'étant pas contrôlées avant la ligation.

∴ SDN2 et ODM

Les éditions du génome de type ODM et SDN2 résultent de la modification de quelques nucléotides sur l'ADN cible en présence d'une matrice de réparation homologue différant uniquement de quelques nucléotides par rapport à la séquence initiale.

L'oligonucléotide ou la matrice de réparation homologue pourront être utilisés comme brin de référence par les mécanismes de réparation de l'ADN de type RH ou Réparation des mésappariements afin de modifier précisément la séquence allélique initiale et créer un nouveau variant allélique.

- ODM

Les éditions du génome par ODM permettent la modification d'allèles sans induction de coupure de l'ADN. Par homologie de séquence, l'oligonucléotide s'hybride à la séquence cible avec création de mésappariements au niveau des quelques bases non-homologues entre celui-ci et la séquence cible. Les mécanismes de contrôle de l'intégrité de l'ADN vont détecter ce mésappariement de séquences et ainsi activer les mécanismes de réparation de l'ADN par correction des mésappariements (Igoucheva et al., 2004).

Les mécanismes de réparation de l'ADN par correction des mésappariements vont permettre la réparation de la double hélice d'ADN en prenant comme matrice l'un des brins d'ADN hybridés, pouvant alors conduire à la modification stable de la cible génomique par la séquence de l'oligonucléotide.

- SDN2

Les éditions du génome de type SDN2 résultent de la coupure de l'ADN par une nucléase dirigée en présence d'une matrice de réparation homologue. La matrice de réparation homologue s'hybride avec les deux extrémités libérées de l'ADN cible après coupure et les mécanismes de

réparation de l'ADN par RH vont se servir de cette matrice de réparation comme « modèle » pour réparer la cassure double brin de la double hélice.

Il a été démontré que la création d'une coupure double brin au niveau de la séquence d'ADN receveur augmente d'un facteur 10 (Puchta et al., 1996) la probabilité d'induire une recombinaison entre l'ADN cible et la matrice apportée. Les techniques SDNs sont donc bien plus efficaces pour éditer le génome que la technique ODM, ceci bien qu'il semble que l'action conjuguée des technologies SDNs et ODM semblent augmenter leurs efficacité respectives (Sauer et al., 2016). Dans la suite de ce rapport les éditions ODM seront volontairement non traitées au profit des éditions SDNs.

∴ SDN3

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 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 afin d'intégrer de manière ciblée la séquence voulue.

Les modifications de type SDN 3 peuvent permettre de la cisgénèse ciblée, de l'intragénèse ciblée ainsi que de la transgénèse ciblée en permettant la recombinaison au niveau d'un site prédéfini de larges séquences d'ADN (Cardi et Stewart, 2016; Petolino, 2015).

La différence technique entre les modifications du génome de type SDN2 et SDN3 tient en la longueur de la séquence nouvelle apportée par la matrice de réparation.

2.3 Parallèle avec d'autres techniques de création variétale

Bien que ces nouvelles techniques d'édition du génome semblent être en voie de révolutionner notre vision de la génomique et de la production de nouvelles variétés végétales, d'autres techniques plus anciennes permettent des modifications similaires sur les génomes végétaux et leur expression. Parmi ces techniques plus anciennes, nous pouvons citer les techniques de

mutagénèse induite et de Tilling, ainsi que les techniques d'ARN interférence et de transformation génétique.

∴ RNAi

La technique de création variétale par ARN interférence (ou « RNAi ») permet de dégrader les ARN messagers (ou « ARNm ») issues de l'expression d'un gène donné, et ainsi diminuer la quantité de protéines traduites et donc produites. Cette régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes nécessite la production de petits ARN interférents double brins en épingle à cheveux, non traduits en protéines, spécifiques et homologues à la séquence nucléotidique à rendre "silencieuse". Afin de produire ces petits ARN interférents, il est nécessaire de transformer stablement la plante avec un construit spécifique à la cible.

La technique de création variétale par RNAi peut être comparée aux techniques d'édition du génome de type SDN1 en KO, ces deux technologies ayant pour objectif d'empêcher la production de protéines dites "défavorables" pour le trait donné (Morgens et al., 2016).

La technique RNAi, contrairement aux éditions du génome de type SDN1, n'inactive pas le gène lui-même mais la formation de son produit. L'inactivation de l'expression du gène est partielle en RNAi ce qui peut cependant être intéressant quand l'inactivation totale du gène cible induit trop d'effets pléiotropiques ou quand elle est létale pour la plante (Fu et al., 2007). Inversement, l'effet RNAi peut être insuffisant si le produit de la traduction du gène cible est présent en quantité suffisante pour induire une réponse totale bien que partiellement produit (Barrangou et al., 2015; Morgens et al., 2016)

∴ Mutagénèse aléatoire induite et stratégie par Tilling

Les techniques d'édition du génome de type SDN1 et SDN2 permettent également d'envisager des stratégies de mutagénèse comparables aux techniques couramment utilisées en sélection de mutagénèse aléatoire induite et de Tilling.

La technique de création variétale par mutagénèse permet de créer des mutations aléatoires dans le génome végétal, avec l'objectif de produire des plantes présentant un phénotype d'intérêt agronomique. Les graines des plantes à modifier sont exposées à des agents mutagènes chimiques (en générale l'EMS) ou physiques (en général des rayonnements ionisants γ ou UV) avant d'être mises en germination pour ainsi permettre de phénotyper et/ou génotyper les

mutations d'intérêt. Les plantes avec un phénotype ou un génotype intéressant pourront être intégrées ensuite dans les schémas classiques de sélection.

La technique de création variétale par mutagenèse aléatoire induite peut être comparée aux techniques d'édition du génome de type SDN1 et SDN2, l'ensemble de ces techniques ayant pour objectif de modifier sur de courtes distances la séquence nucléotidique de l'ADN. Tout comme la stratégie SDN1, la mutagenèse aléatoire induite crée une mutation « au hasard », sans prédétermination de la séquence d'ADN finale. Cependant, la stratégie SDN1 n'induit théoriquement qu'une mutation au niveau de sa cible (excepté les potentielles mutations hors cibles) alors qu'il est impossible de prédéfinir le nombre et les sites de mutation par mutagenèse aléatoire induite. De plus les SDNs peuvent être modifiées afin d'induire la modification programmée d'une seule base de l'ADN ce qui est impossible avec la technique de RNAi (Komor et al., 2016).

Dans une stratégie de Tilling (Targetting Induced Local Lesion IN Genomes) couramment employée en sélection (McCallum et al., 2000), il est nécessaire de produire de très grandes collections de mutants induits afin d'identifier des mutations menant à des phénotypes intéressants d'un point de vue agronomique. Ces stratégies détectent principalement des mutations nulles (perte totale de fonction), alors que la modification ciblée du génome permet, elle, de générer des mutations directement dans les gènes souhaités et de disposer d'une grande variété d'allèles au sein d'un nombre limité d'individus (VIGE, Variation Induced by Genome Editing).

∴ Transformation génétique

La technique de création variétale par transformation génétique permet d'exprimer un gène nouveau ou de limiter l'expression d'un endogène (phénomènes d'interférence) par insertion aléatoire d'un construit génétique dans le génome de la plante cible. Cette transformation génétique permet également de contourner les barrières de croisement entre espèces, rendant accessible de nouvelles sources de gènes pour l'amélioration végétale. Le construit génétique intégré aléatoirement dans le génome végétal peut être un cisgène, un intragène ou un transgène.

La transformation génétique peut se faire de manière directe par la biolistique qui permet grâce à la force de tir d'un canon à particules de faire pénétrer dans les cellules végétales de l'ADN préalablement adsorbé à des micro-billes d'or ou de tungstène, elle peut également se faire de

manière indirecte par des bactéries de type *Agrobacterium* capables de transférer une portion de leur plasmide situé entre deux bordures jusqu'au génome végétal.

La technique de création variétale par transformation génétique peut être comparée à la technique d'édition du génome SDN3 permettant l'insertion de larges séquences nucléotidiques dans le génome de la plante cible. Cependant, la technique SDN3 permet de cibler précisément le site d'insertion du construit génétique, évitant ainsi les insertions au milieu de séquences codantes ou dans une zone mal exprimée du génome.

2.4 Utilisations des SDNs en amélioration des plantes en dehors de l'édition du génome au sens strict

Les nucléases dirigées de type ZFN, TALEN et de manière plus aisée CRISPR, par leur capacité à reconnaître des séquences nucléotidiques spécifiques et programmées, peuvent être adaptées en biotechnologies et créations variétales pour d'autres applications moléculaires que l'édition du génome *sensu stricto*. L'activité nucléasique des SDNs peut ainsi être supprimée ou remplacée par une autre activité enzymatique afin d'autoriser des actions ciblées sur les génomes. Ou bien, cette activité peut être conservée afin de modifier d'autres séquences nucléotidiques que celles de l'ADN génomique.

∴ Modulation de l'expression des gènes

Les SDNs modifiées peuvent être utilisées pour moduler l'expression de gènes en inactivant ou en activant leur transcription, Trois types de manipulation sont possibles pour moduler l'expression de gènes natifs grâce aux nucléases (Dominguez, Lim, et Qi 2015; Evers et al., 2016)

- La SDN dont l'activité nucléasique est inactivée peut se fixer au niveau de son site cible sans induire d'activité enzymatique, cette fixation sur l'ADN crée un encombrement stérique qui bloquera l'ARN polymérase et stoppera ainsi l'élongation durant la phase de transcription de l'ADN.
- La fixation de la SDN désactivée au niveau d'un site de fixation de facteurs de transcription (activateur ou inhibiteur) peut empêcher les modulations de l'expression génique.

- Les SDNs désactivées peuvent également être couplées à des facteurs spécifiques d'inhibition ou d'activation de la transcription afin de réduire ou d'augmenter le taux de transcription d'un gène donné (Kabadi et Gersbach, 2014).

Afin que ces modulations ne soient pas uniquement provisoires par la dégradation des SDNs sous forme protéique, il est nécessaire que la séquence codant la nucléase soit intégrée stablement dans le génome de la plante, soit par transgénèse classique, soit par SDN3.

∴ Modifications épigénétiques

Les SDNs modifiées dont l'activité nucléasique a été inactivée peuvent être utilisées pour moduler l'expression de gènes en modifiant la structure de la chromatine au niveau d'un site donné du chromosome cible (Kearns et al., 2015; Mendenhall et al., 2013; McDonald et al., 2016; Vojta et al., 2016). Cette technique de modification épigénétique du génome par SDN inactivé est en lien direct avec la technique NBT RdDM.

Une enzyme de type méthylase/déméthylase ou acétylase est fusionnée avec la SDN dont l'activité nucléasique est inactivée. La SDN conservant sa spécificité de liaison à l'ADN, la modification épigénétique induisant la compaction/décompaction des histones sera locale et ciblée (Xu et al., 2016; Dominguez et al., 2015). Cette modification de la structure de la chromatine « ouvrira » ou « fermera » l'accès aux gènes et permettra ou non leur expression.

Les modifications épigénétiques de type méthylation/déméthylation et acétylation sont potentiellement hérissables et transmises à la descendance des organismes sur un certain nombre de générations. La séquence codant la SDN n'est donc pas obligatoirement intégrée de façon stable dans le génome de la plante.

∴ Modifications de l'ARN

Les SDNs de type CRISPR peuvent être modifiées afin de cibler l'ARN au lieu de l'ADN. La nucléase Cas9 est alors remplacée par une nucléase ARN spécifique (Abudayyeh et al., 2016; O'Connell et al., 2014; Nelles et al., 2016).

Cette modification de séquence nucléotidique sur l'ARN étant post-transcriptionnelle, il est probable qu'une partie des ARNs cibles transcrits échappent à l'édition. De plus, la mutation induite par l'action de la nucléase sera différente sur chaque ARNs édité par SDN1.

Afin que l'édition des ARNs transcrits soit permanente et puisse être transmise à la descendance, il est nécessaire que le gène codant la nucléase ARN spécifique soit transformé de façon stable dans le génome.

∴ Défense endogène contre les virus

Les CRISPR sont initialement des enzymes de l'immunité des bactéries leur permettant d'acquérir une immunité contre les virus auxquels elles ont déjà été exposées. Ce mécanisme d'immunité contre les attaques virales peut être apporté à des organismes eucaryotes qui en sont dépourvus, comme les plantes, en leur faisant exprimer de manière stable par transgénèse ou SDN3 les protéines SDNs actives ciblant des séquences virales spécifiques (Zahir et al., 2015; Baltés et al., 2015; Ji et al., 2015; Chandrasekaran et al., 2016). Dans ce cas, les séquences guides utilisés ciblent des séquences communes à des familles de virus dès leur arrivée dans la cellule et induisent une diminution de la réplication de l'ADN viral.

Cette transformation stable de la plante s'apparente à une vaccination du végétal transformé contre les virus pathogènes (Hummel, Voytas et Baltés 2015; Iqbal, Sattar et Shafiq 2016). La plante étant transformée de manière stable avec la séquence codant pour la SDN, cette immunité pourra être transmise à la descendance selon les règles classiques de ségrégation.

∴ « Gene Drive »

Les SDNs peuvent également permettre la diffusion ou l'éradication de gènes ou d'allèles à l'échelle d'une population par la stratégie Gene-Drive.

Afin d'atteindre cet objectif, une cassette Gene-Drive composée d'une séquence codant pour une SDN active ainsi que le gène à propager est transformée de manière stable dans le génome d'un organisme vivant. La SDN active ciblera spécifiquement le gène ou l'allèle à supprimer de la population et induira une cassure double brin au niveau de cette cible. Les mécanismes de réparation de l'ADN par recombinaison homologue permettront la réparation de cette lésion en « recopiant » la cassette Gene-Drive homologue à la cible à ses extrémités. Le génome ainsi modifié est homozygote pour la cassette Gene-Drive. Cette stratégie permet alors dans un faible nombre de générations d'éliminer un gène ou un allèle d'une population (Hammond et al., 2016)

Cette stratégie est principalement étudiée pour l'éradication de moustiques vecteurs de maladies tels que le paludisme ou la malaria. Chez les plantes on peut imaginer l'utilisation de

cette stratégie Gene-Drive pour permettre par exemple l'élimination de gènes de résistances aux herbicides dans des populations d'adventices.

3 Utilisation en création variétale et dans la filière végétale : exemples et limites

Un grand nombre de publications scientifiques et de brevets ont été soumis depuis la découverte des techniques d'édition du génome. La fréquence de ces publications s'est grandement intensifiée avec la découverte des nucléases de type CRISPR qui a permis une plus grande accessibilité à ces techniques d'édition du génome dans les laboratoires de recherche du monde entier, que ce soit en biologie animale, végétale, microbienne ou fongique.

La quasi-totalité des publications scientifiques montrant des phénomènes d'édition du génome sont produites par SDN1 ; en effet, les SDN2 et 3 restent délicates à mettre en œuvre et demandent encore d'importants développements pour augmenter les probabilités de recombinaison homologue entre l'ADN cible et la matrice de réparation.

3.1 Utilisation en création variétale

A ce jour, de nombreuses études ont déjà rapporté 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 est plus ou moins avancée (Nogué et al., 2016) : la majorité des programmes sont encore à des stades très précoces de preuve de concept (ou « POC » selon l'acronyme anglais de « Proof Of Concept »), d'autres aboutissent déjà à des essais au champ, voire sont en phase de production.

Parmi les applications agronomiques des éditions des génomes pour lesquelles des preuves de concept ont déjà été produites, on compte notamment :

- Des traits liés à la tolérance aux herbicides produite par remplacement des allèles du gène ALS (Aceto Lactate Synthase) chez le riz à l'aide de TALENs (Sun et al., 2016) et le tabac à l'aide de ZFNs (Townsend et al., 2009). Les traits de résistance aux herbicides sont fréquemment étudiés, notamment pour le POC. En effet, le criblage et la sélection

des évènements édités sont facilités pour les plantules régénérées, par incorporation directe de l'herbicide en tant qu'agent de sélection dans les milieux de culture *in vitro*.

- Des caractères innovants liés à la qualité nutritionnelle et à l'aptitude à la transformation ont aussi été développés, comme par exemple, chez la pomme de terre, où la mutation simultanée par TALENs des 4 allèles du gène VInv (vacuolar invertase) a permis de diminuer l'accumulation de sucres réducteurs pendant le stockage au froid des tubercules et ainsi de limiter la production d'acrylamide lors de la friture (Clasen et al., 2016). Un riz parfumé a été créé par mutation du gène BADH2 à l'aide de TALENs (Shan et al., 2015). Des tomates aux profils de maturation modifiés ont été produites par mutation du locus RIN par le système CRISPR/Cas9 (Ito et al., 2015). Des lignées de soja dont l'huile présente une teneur réduite en acides gras saturés ont été obtenues grâce à des TALENs ciblant le gène codant la désaturase 2 (Haun et al., 2014).
- La tolérance aux maladies est également un enjeu majeur pour l'édition des génomes. Elle peut se conférer par insertion d'allèles de résistance ou par knock-out de gènes de sensibilité. Chez le blé tendre, la mutation par des TALENs des 3 gènes homéologues MLO a permis d'obtenir une résistance à l'oïdium (Wang et al., 2014). Une résistance au feu bactérien chez le riz a aussi pu être développée par TALENs et CRISPRs ciblant le site de fixation des effecteurs TALEs du pathogène (Li et al., 2012; Zhou et al., 2015).
- Une augmentation de productivité des cultures par édition du génome. Par exemple avec l'augmentation de la taille des grains de riz par mutagenèse ciblée (Xu et al., 2016).

De même, quelques brevets référant à l'utilisation des SDNs pour des applications agronomiques ont déjà été soumis (Tableau 1) :

Tableau 1 Tableau référençant les brevets soumis et faisant référence à l'utilisation des SDNs pour des applications agronomiques.

Titre	N° de Brevet	Technologie
ÉDITION D'UN GÉNOME CIBLÉ POUR MODIFIER LA BIOSYNTHÈSE DE LA LIGNINE ET LA COMPOSITION DE LA PAROI CELLULAIRE (Altpeter et Jung 2015)	WO2015168158	TALENs
PROCÉDÉS ET MOYENS POUR AUGMENTER LA TOLÉRANCE AU STRESS ET LA BIOMASSE CHEZ DES PLANTES (Barak et al., 2016)	WO2016050512	Toutes nucléases
POTATOES WITH REDUCED COLD-INDUCED SWEETENING (Mathis, Voytas, Zhang, Clasen, et al., 2014)	WO2014096972	TALENs
POMMES DE TERRE À TENEUR RÉDUITE EN ENZYME GBSS (Clasen, Voytas, et Zhang 2015)	WO2015193858	TALENs

PLANTES AVEC DES GÈNES ENDOGÈNES MODIFIÉS (Raab et al., 2016)	WO2016054039	TALENs
		CRISPR
MODIFYING SOYBEAN OIL COMPOSITION THROUGH TARGETED KNOCKOUT OF THE FAD2-1A/1B GENES (Mathis, Voytas, Zhang, et Haun 2014)	WO2014141147	TALENs
GENE TARGETING AND GENETIC MODIFICATION OF PLANTS VIA RNA-GUIDED GENOME EDITING (Yang et Xie 2014)	WO2014194190	CRISPR
GENERATION OF SITE-SPECIFIC-INTEGRATION SITES FOR COMPLEX TRAIT LOCI IN CORN AND SOYBEAN, AND METHODS OF USE (Cigan et al., 2016)	WO2016040030	Toutes nucléases en SDN3
ENGINEERED ZINC FINGER PROTEINS TARGETING S-ENOLPYRUVYL SHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE GENES (Gupta et al., 2013)	WO2009042164	ZFN
COUPLING HERBICIDE RESISTANCE WITH TARGETED INSERTION OF TRANSGENES IN PLANTS (Mathis, Voytas, Li, Zhang, et al., 2014)	WO2014071006	TALENs
		ZFN
		Méganucléases
CONFERRING RESISTANCE TO GERMINIVIRUSES IN PLANTS USING CRISPR/CAS SYSTEMS (Hummel, Voytas, et Baltes 2015)	WO2015048707	CRISPR
COMPOSITIONS AND METHODS FOR PRODUCING PLANTS RESISTANT TO GLYPHOSATE HERBICIDE (Djukanovic et al., 2016)	WO2016007347	CRISPR

3.2 Modification d'autres organismes biologiques de la filière végétale

Les techniques NBT dites d'édition du génome, en plus de rendre possible la modification ciblée des génomes végétaux, peuvent permettre l'édition des génomes de tous les organismes vivants et notamment ceux pouvant être en interaction avec les plantes cultivées ou intervenant dans leurs processus de transformation finale. Ces organismes peuvent être des bactéries, des insectes, des mycètes ou des levures.

L'édition des génomes dans un contexte de production végétale peut alors être considérée de manière plus globale que la seule modification du génome de la plante dans la production de semences, plants et produits végétaux.

∴ Environnement

On peut imaginer utiliser les SDNs pour agir sur les différentes aptitudes des plantes par édition des autres éléments biologiques du système de culture en modifiant par exemple le génome de certains organismes du sol et de l'environnement ayant un impact sur les productions végétales (Ben-Shahar, 2014). Cette approche reste cependant extrêmement prospective étant donnée la

complexité des interactions des écosystèmes culturels entre végétaux, bactéries, mycètes, insectes pollinisateurs et autres organismes.

Il est alors intéressant d'imaginer l'impact possible des techniques d'éditions du génome sur les productions végétales non pas comme un système clos à la génomique végétale, mais que ces techniques pourraient également prendre en compte les interactions entre les différents organismes du milieu. Une telle stratégie pourrait alors permettre par exemple d'augmenter la disponibilité en azote du sol, d'optimiser la pollinisation des cultures par exemple ou de permettre la croissance végétale dans des milieux fortement salins (Pereira et al., 2016).

∴ Processus de transformation du produit

Dans un objectif de produire des aliments transformés de meilleure qualité nutritionnelle ou afin de faciliter leur transformation, il est courant d'utiliser des micro-organismes soit de manière directe (levures pour la transformation de la bière par exemple) soit de manière indirecte en les utilisant pour produire les enzymes d'intérêt (lipases pour les huiles par exemple), les micro-organismes utilisés de manière directe étant actuellement autorisés dans la réglementation (« Transgéniques : pour des choix responsables » 2016).

L'utilisation des techniques d'édition du génome pour améliorer ces micro-organismes catalyseurs pourrait permettre la vision d'un niveau supplémentaire dans l'impact de ces nouvelles techniques dans l'alimentation humaine et animale.

3.3 Limites dans l'utilisation des techniques d'édition du génome

Bien que ces techniques d'édition du génome puissent avoir un grand nombre d'applications concrètes en biologie des plantes, elles restent néanmoins des technologies récentes nécessitant encore d'importants développements préalables à leur utilisation en routine dans l'ensemble des programmes de recherche et de sélection.

∴ Protocoles de transformation/ régénération

Dans l'objectif de produire des plantes éditées non chimériques, il est nécessaire que l'édition du génome ait lieu au niveau de cellules germinales ou pluripotentes. Pour ce faire, les cellules doivent être transformées de manière stable ou transitoire avec la séquence codant la ou les nucléases ainsi que la séquence codant la matrice de réparation homologue dans le cas des modifications de type SDN2 et SDN3. Les cellules ainsi éditées devront ensuite être sélectionnées et régénérées en plantules viables par culture *in vitro* ou germination classique dans le cas des espèces pouvant être transformées par Floral-Dip (courant pour *Arabidopsis thaliana*, peu ou pas efficace pour la majorité des autres espèces végétales).

Il est cependant possible de procéder à une édition du génome sans transformation génétique, même transitoire, en apportant la nucléase au niveau de la cellule cible sous forme de protéine (Voytas et al., 2014), cependant cette intégration relève des mêmes techniques que la transformation classique et il peut s'avérer délicat de sélectionner les plantes éditées.

Bien que de grandes avancées dans le développement de protocoles de transformation génétique et de régénération cellulaire aient été obtenues dans les années 1980-2000 avec la démocratisation de la transformation génétique, ceux-ci restent encore peu efficaces pour la majorité des espèces et/ou variétés cultivées (Nam, 1997) notamment pour les variétés élites qui sont en général très récalcitrantes à la transformation/régénération du fait de la non sélection de ce caractère. Cette faible efficacité de transformation/régénération limite à l'heure actuelle le développement des techniques d'édition du génome à l'ensemble du règne végétal et d'importants programmes de développement devront être mis en place pour faciliter la transformation/régénération de l'ensemble des espèces (Altpeter et al., 2016).

∴ Identification de la cible et mutations hors cibles

Afin d'optimiser les chances de réussite de l'édition du génome, il est nécessaire de choisir de manière précise la cible des nucléases à utiliser. La séquence cible doit être unique avec une similarité la plus faible possible avec d'autres portions du génome (Tsai et al., 2015). Si la définition de la nucléase n'est pas optimale, celle-ci peut reconnaître par erreur d'autres portions du génome fortement similaires, s'hybrider et ainsi induire des coupures hors cibles (ou en anglais : « Off Target »). Ces mutations hors cibles peuvent intervenir au niveau de séquences codantes du génome de la plante ce qui peut dans de rares cas créer un phénotype indésirable au niveau de la plante produite. Néanmoins, au cours de chaque méiose des

mutations naturelles, sans interventions de nucléases, se produisent dans les cellules végétales, la création de mutation hors cibles est donc à relativiser.

De plus, sont publiées régulièrement dans la littérature des optimisations des nucléases et notamment de la Cas9 afin de diminuer cet effet Off Target (Duchateau et Bertonati 2014; Cho et al., 2014; Ledford 2015; Braff et al., 2016; Tsai et al., 2015; Mikami, Toki et Endo 2016; Slaymaker et al., 2016) ; en parallèle plusieurs logiciels performants pour la recherche de cibles optimales ont été développés (Michno et al., 2015; Ravinder et al., 2016). Ces différentes améliorations conduisent à un effet Off Target nul ou négligeable dans les dernières publications scientifiques sur le sujet.

∴ Connaissances des génomes

Pour obtenir le phénotype souhaité après édition du génome, il est nécessaire d'avoir une connaissance complète et précise des gènes, de leurs régulations ainsi que de leurs différentes interactions. En effet, le génome est un système complexe, multi-régulé et compensé, où l'ancien dogme : « Un gène = Une fonction » est désormais complètement erroné et une mutation sur un gène avec une fonction connue peut induire d'autres modifications inattendues (Zhao et al., 2016). Toutes les espèces cultivées ne sont à l'heure actuelle pas séquencées et/ou annotées et la compréhension des différents mécanismes génétiques n'est déterminée que pour les traits simples et peu régulés dont l'expression est dépendante d'un seul ou d'un faible nombre de gènes. La compréhension et la connaissance des génomes des espèces cibles sont donc primordiales à la réussite des programmes d'édition futurs, ceci en particulier pour les traits dits complexes.

4 Incidence de l'utilisation des techniques d'édition du génome sur l'innovation variétale

L'ensemble de ces techniques d'édition du génome par nucléases dirigées, et en particulier celle faisant intervenir la nucléase de type CRISPR/Cas9 semble offrir de grandes possibilités afin de modifier les schémas de création variétale actuelles. Ces modifications pourront alors avoir un impact sur les techniques de sélection ainsi que sur les caractères des plantes produites et proposées à l'inscription.

4.1 Incidence sur les caractères des plantes éditées

4.1.1 Les espèces travaillées

D'un point de vue biologique, le développement des techniques d'édition du génome est compatible avec un élargissement du nombre d'espèces travaillées en amélioration des plantes, ceci afin de permettre le progrès génétique rapide d'un grand nombre d'espèces dites « mineures ».

Même si les SDNs peuvent contribuer à une agroécologie de performance, leur application dans les schémas de sélection persiste à ne relever que d'un choix stratégique des sélectionneurs en regard de la loi du marché. Les contraintes économiques imposeront le choix des caractères (en fonction de leur valeur pour l'agriculteur et la filière) et des espèces (inféodées aux surfaces cultivées si la technique utilisée est chère à mettre en place). Même si les coûts d'obtention peuvent être réduits grâce aux SDNs, les charges liées à la réglementation, si elles sont importantes, seraient être un frein à leur utilisation pour la démocratisation des SDNs dans les productions agricoles. Si les produits issus d'édérations SDN1 et SDN2 ne sont pas considérés comme OGM mais que les techniques d'édition du génome qui ont permis leur création font l'objet de droits de licence élevés, leur utilisation ne sera possible que pour des espèces à très fort retour sur investissements, comme le maïs et le soja, et restera inapplicable et inaccessible pour les autres cultures (blé et tomate par exemple). L'acceptation sociétale de ces produits sera également déterminante afin de permettre la mise en place et la conduite complète des essais au champ nécessaires au développement de nouvelles variétés éditées ainsi que pour leur acceptation dans les produits alimentaires.

∴ Espèces majeures

L'édition des génomes est en théorie applicable à toutes les espèces pour lesquelles il existe des protocoles fiables de transformation et de régénération, comme c'est le cas à l'heure actuelle pour la majorité des espèces majeures. Il est cependant préférable de disposer d'un génome de référence séquencé pour définir les cibles des SDNs et évaluer puis tracer les éventuelles mutations hors-cibles. L'annotation de ce génome facilitera aussi l'identification des gènes ou séquences candidats.

La possibilité de modifier directement le génome de variétés élites et de réduire les plans de croisements nécessaires à l'introgession des QTLs et gènes candidats sera un atout pour toutes

les espèces cultivées, et en particulier celles à cycle long et/ou présentant une faible diversité génétique (espèces forestières, fruitières, vigne) (Ren et al., 2016).

∴ Espèces mineures

En réduisant les coûts de développement, les SDNs pourraient aussi permettre de consacrer plus d'efforts à des espèces présentant moins de retours sur investissements, telles que certaines espèces mineures (potagères, fruitières, ornementales (Xiong et al., 2015)), ainsi que des espèces orphelines (sorghum, millets, arachide, dolique, haricot commun sec, pois chiche, pois d'Angole, manioc, igname et patate douce) pour des marchés particuliers (Varshney et al., 2012). Le niveau des connaissances (protocoles de transformation, génomes de référence) mais surtout les débouchés de ces espèces resteront tout de même des facteurs limitants.

Ces questionnements soulèvent aussi des enjeux sur la biologie translationnelle et les possibilités de transfert de connaissances d'une espèce à une autre. Aujourd'hui les connaissances sur le fonctionnement des plantes et des peuplements sont très différentes d'une espèce à l'autre. L'enjeu est-il de comprendre et de décortiquer le fonctionnement d'un nombre réduit de modèles et ensuite transférer ces résultats sur d'autres espèces, ou bien considère-t-on que chaque espèce ou groupe d'espèces a trop de spécificités pour bénéficier de démarches translationnelles et devra développer ses propres programmes de recherche ?

Les démarches translationnelles entre espèces proches devront également prendre en compte l'impact de l'organisation du génome sur les transferts de connaissances à partir d'une espèce modèle. En fonction du niveau de ploïdie, du taux d'éléments répétés, de l'organisation en zones homéologues, homologues ou paralogues du génome, la modification d'un génome par les techniques d'édition devra être adaptée

4.1.2 Les traits modifiés

Les techniques d'édition du génome, qu'elles soient de type SDN1, SDN2/ODM ou SDN3, sont encore des techniques nouvelles et un grand nombre de développements restent à faire avant d'avoir les moyens d'entreprendre n'importe quelle modification dans les génomes des plantes cultivées. L'utilisation des techniques d'édition du génome semble particulièrement adaptée à l'ingénierie de caractères mono- et oligogéniques à effets forts pour lesquels les voies de

biosynthèse sont déjà connues et identifiées. Pour les caractères quantitatifs dépendant d'un grand nombre de gènes à effets faibles, comme pour l'hybridation, l'insertion des gènes candidats par édition du génome ne conduira pas forcément au phénotype attendu en raison de la perte des interactions génétiques impliquées dans l'expression des caractères (Takeda et Matsuoka, 2008).

Les premières applications agronomiques de type SDN1 et quelques-unes de type SDN2 et SDN3 ont été publiées et/ou brevetées, mais les éditions du génome faisant intervenir les mécanismes de recombinaison homologue ne sont pour l'instant qu'au stade de preuve de concept chez de nombreuses espèces et restent encore assez difficile à réaliser. Il est donc nécessaire de visualiser les traits pouvant être modifiés par édition du génome en deux étapes : une étape à court terme principalement de preuve de concept avec des éditions simples et une étape à plus long terme permettant l'édition de caractères plus complexes.

A court terme, les caractères développés par édition du génome seront principalement produits par induction de mutations ponctuelles dans des gènes cibles sans intégration d'ADN donneur. La difficulté d'emploi des technologies permettant le remplacement d'allèles par RH conduisant à l'insertion d'une séquence exogène limite les applications agronomiques envisageables dans l'immédiat. A moyen et à long terme, lorsque le remplacement d'allèles sera mieux maîtrisé, le champ des possibles s'ouvrira alors largement : dans un premier temps, pour des caractères à déterminisme simple tels que des tolérances aux maladies, aux herbicides ou des facteurs de qualité, et à plus long terme, pour des caractères plus complexes dépendant de la modification de plusieurs gènes (voies métaboliques entre autre) ou pour constituer des génotypes présentant des assortiments d'allèles favorables pour un ou plusieurs caractères donnés.

∴ A court terme

A court terme, il semble que la filière semence s'oriente vers une application de l'édition du génome à la sélection de caractères déjà couramment travaillés, comme pour le maïs waxy de Dupont Pioneer dont le trait apporté n'est pas nouveau dans l'espèce. L'intérêt de ce type d'approche est, d'une part, de tester et de comparer la méthodologie sur des modèles dont on a une très bonne connaissance, et, d'autre part, de prendre pour objectif l'optimisation de l'expression de ces caractères dans des contextes génétiques variés par la modification directe d'une gamme de lignées élites et la création de bibliothèques d'allèles pour chaque gène ciblé. Cette première étape à court terme permettra ainsi aux obtenteurs de s'approprier et maîtriser les fondamentaux des techniques SDNs.

∴ A long terme

Il est très probable qu'à long terme, avec l'avancée des connaissances génomiques ainsi que l'avancée des connaissances sur les techniques de recombinaison homologue pour faciliter la production de traits SDN2 et SDN 3, il soit possible de créer des variétés végétales présentant des caractères totalement innovants par rapport aux productions actuelles.

A long terme, les techniques d'édition du génome, qui constituent de bonnes alternatives ou des compléments efficaces aux approches existantes d'identification et de création de variabilité, devraient contribuer au développement de nouveaux phénotypes avec l'acquisition de connaissances accrues du fonctionnement génomique et physiologique des plantes et des voies métaboliques impliquées dans le contrôle des différents traits. En plus d'un travail sur la connaissance approfondie du fonctionnement des plantes et des voies métaboliques impliquées dans les différents traits d'intérêt, il existe aussi des enjeux autour de la régulation de l'expression des gènes, que ce soit dans le temps ou dans les différents organes de la plante, en fonction de conditions environnementales, et qui pourraient permettre de moduler l'expression de ces caractères.

D'après les analyses bibliographiques et les interviews de différents acteurs de la filière, nous pouvons prédire un certain nombre de domaines où les SDNs pourraient, à long terme, permettre de dépasser certaines limitations actuelles.

- Adaptation génotype / environnement

Les méthodes d'édition des génomes ouvrent de larges perspectives de développement de caractères de tolérance aux stress abiotiques (sécheresse, salinité, température par exemple) (Osakabe et al., 2016) et biotiques. Les SDN3 offrent en particulier un potentiel énorme de réactivité et d'adaptation par rapport à des situations de multi-stress grâce à l'utilisation de systèmes inductibles par les différentes conditions environnementales par l'utilisation de promoteurs inductibles (Piatek et al., 2015; Liu et al., 2016).

Si l'on dispose d'une bonne connaissance des gènes impliqués dans la réponse aux différents stress abiotiques et biotiques, la souplesse d'utilisation des SDNs font d'elles un atout dans la course contre l'évolution des pathogènes et la variabilité des stress environnementaux (Hua 2016; Hadidi et al., 2016) ; elles rendent également possible la création de portefeuilles de versions alléliques pour les gènes de résistance qui pourraient être associés soit au sein d'une même variété, soit dans des mélanges de variétés pour une meilleure gestion de différents stress

biotiques et abiotiques à l'échelle de la parcelle et du territoire. Par ce biais, les SDNs viennent soutenir la perspective de développer des variétés pour leur capacité à interagir avec d'autres et avec leur environnement, permettant de créer une offre variétale diversifiée, adaptée et réactive. Il sera également potentiellement possible de réagir très rapidement à des modifications de stress ou bien à l'apparition de résistances par la réédition de ces lignées.

Les SDNs pourraient également permettre de favoriser la symbiose avec les micro-organismes du sol afin d'améliorer l'efficacité d'utilisation de l'azote, elles pourraient également permettre de stimuler les capacités d'interaction de la plante avec des virus ou des endophytes vertueux par exemple.

- Optimisation de la photosynthèse et la respiration cellulaire

En plus de leur capacité à cibler le génome nucléaire des plantes, les SDNs ont la capacité de cibler l'ensemble des séquences nucléotidiques des cellules végétales, y compris les séquences des génomes mitochondriaux ainsi que des différents plastes cellulaires. Cette fonctionnalité des SDNs laisse alors envisager la possibilité d'éditer les gènes impliqués dans la respiration et la photosynthèse afin d'augmenter leur efficacité (Bock et Knoop, 2012; Ort et al., 2015).

- Modification des voies métaboliques

Elles ouvrent également des perspectives pour l'ingénierie métabolique avec la possibilité d'activer ou d'inhiber les acteurs de voies de synthèse complexes (métabolites secondaires par exemple) et leurs réseaux de régulation (facteurs de transcription par exemple).

Par ailleurs, l'édition des génomes pourrait contribuer au développement de variétés adaptées à la production d'énergie durable, par modification des voies de synthèse des lignines. Parmi les espèces concernées, le peuplier (Fan et al., 2015), le soja (Jacobs et al., 2015), le sorgho (Jiang et al., 2013) et le maïs (Liang et al., 2014; Svitashv et al., 2015) ont déjà fait l'objet d'études démontrant l'efficacité du système CRISPR/Cas9.

La modification des voies métaboliques végétales pourrait également être employée pour la production de molécules pharmaceutiques ou cosmétiques en induisant leur surproduction ou leur synthèse nouvelle dans les tissus végétaux. Il est envisagé par exemple d'enrichir certaines

céréales en caroténoïdes (Zhai et al., 2016). De même, la technologie TALEN a permis de modifier les ratios d'acide oléique et d'acide linoléique chez le soja (Haun et al., 2014).

- Optimisation de la pollinisation et des fécondations

Les problèmes de pollinisation se posent actuellement pour un certain nombre d'espèces, et notamment pour les espèces potagères pour lesquelles la pollinisation par les insectes pollinisateurs est peu efficace. Les techniques d'édition du génome pourraient permettre de pallier ce manque d'efficacité en proposant des variétés plus attractives pour les insectes.

Pour améliorer le taux de multiplication, il est possible d'imaginer proposer des lignées femelles porte-graines avec un nombre d'ovules beaucoup plus important ou des lignées mâles avec une quantité et une qualité du pollen améliorée. Il est également envisageable de favoriser la production de graines chez des espèces à reproduction végétative de manière à limiter les problèmes sanitaires liés à la production de plants, ou encore de disposer d'une CMS (cytoplasmic male sterility) inductible et donc sans nécessité de restauration.

Toutes ces possibilités multiplient ainsi les différentes composantes impliquées dans la reproduction sexuée des plantes.

- Augmentation de la diversité allélique

L'induction de mutations ciblées, qu'elles soient de type prédéfinies (SDN2) ou non prédéfinies (SDN1) peuvent permettre la multiplication des versions alléliques des gènes aussi bien pour les espèces majeures que les espèces mineures. Cette multiplication des versions alléliques des gènes pourrait alors conduire à la multiplication des allèles favorables à l'amélioration variétale ou à l'introduction d'un nouveau caractère.

- « Rewilding »

En s'inspirant des profils alléliques des ancêtres sauvages des espèces cultivées, les techniques d'édition du génome par création de mutation prédéfinies pourrait permettre l'élimination de certaines mutations défavorables accumulées au cours de la domestication et de la sélection de l'espèces (Palmgren et al., 2015).

- Croisements interspécifiques

Des avancées récentes ont permis d'identifier des régulations épigénétiques au sein de l'endosperme comme responsables des incompatibilités sexuelles entre espèces (Schatlowski et al., 2014). Modifier les voies de régulation par édition du génome pourrait permettre d'augmenter la diversité génétique disponible pour les principales espèces concernées par l'incompatibilité interspécifique. Ainsi en levant les barrières reproductives entre espèces, les SDNs permettraient d'élargir l'ensemble des ressources génétiques disponibles à long terme pour l'ensemble des espèces agronomiques et ornementales d'intérêt en autorisant les intercroisements. L'offre de nouvelles espèces végétales pourrait alors exploser par augmentation de la variabilité génétique pour tous les caractères d'intérêt.

- Réorganisation des génomes

En marge de la mutagenèse et de l'insertion ciblées, les SDNs sont aussi capables d'induire un remodelage (Puchta et al., 1993) et une optimisation du génome des espèces cultivées par la délétion de grands fragments chromosomiques jusqu'à 170 kb (Yan et al. 2016; Zhou et al., 2014), le ciblage de séquences répétées (Endo et al., 2015; Hua 2016), l'inversion ou la réintégration de séquences. Les remaniements structuraux (délétions, insertions, substitutions ou duplications) participent à la différenciation génomique intra-spécifique et les individus qui les portent sont appelés des variants structuraux (Saxena, Edwards, et Varshney 2014; Kraft et al., 2015). Ces variants structuraux peuvent conduire à la création de phénotypes d'intérêt comme des résistances aux maladies (McHale et al., 2012), la modification des périodes de floraison (Díaz et al., 2012) par exemple.

- Optimisation de la recombinaison méiotique

En permettant l'élimination de liaisons défavorables, les SDNs pourraient en outre contribuer à atteindre de meilleurs niveaux d'expression pour certains caractères d'intérêt. En effet, l'édition du génome devrait permettre de progresser vers la maîtrise de la recombinaison méiotique dans l'objectif d'augmenter le brassage génétique et d'orienter les assortiments d'allèles produits. La stratégie consisterait à induire des cassures double-brin au niveau de zones ciblées du génome pour favoriser la survenue de crossing-over conduisant à la recombinaison de régions chromosomiques porteuses d'allèles favorables, ceci tout en rompant leurs liaisons avec d'éventuels allèles défavorables. Pour cela, il est imaginable d'associer les sites de liaison à l'ADN

des SDNs à la protéine SPO11 impliquée dans la formation des cassures méiotiques (Peciña et al., 2002).

- Pyramidage de gènes

Les SDNs sont également des outils intéressants pour assurer une bonne expression des transgènes qu'elles permettent d'empiler à des endroits précis du génome (landing pads) choisis pour leur stabilité, leur environnement génétique, leur niveau d'expression et éventuellement leur fréquence de recombinaison (Ainley et al., 2013; D'Halluin et al., 2013).

- Production de plants et semences

A ce jour, la multiplication des variétés sous forme de plants est confrontée à des problèmes sanitaires, ainsi qu'à un système de maintien et de diffusion beaucoup plus contraignant que celui des variétés multipliées par graines. Cependant, pour un certain nombre d'espèces, la multiplication végétative reste la seule voie possible de diffusion des variétés.

Il est possible d'imaginer qu'avec les techniques d'édition du génome il soit possible d'inhiber les phénomènes de recombinaison méiotique après fécondation sexuée, permettant ainsi de multiplier à l'identique et d'obtenir des graines fertiles pour des plantes aujourd'hui produites et diffusées sous forme de plants.

Ces outils d'édition du génome pourraient également permettre la multiplication à l'identique de lignées hétérozygotes en permettant la production sous forme de graines viables de génotypes apomictiques non issues de fécondation.

4.1.3 Structures génétiques des futures variétés

La structure génétique de futures variétés créées par édition du génome pourrait être modifiée, ce qui pourrait changer la vision des variétés à long terme. Ces changements probables dans la structure génétique des variétés peuvent être identifiés en deux groupes, l'un suite à l'application des stratégies SDN1 ou SDN2/ODM et un second groupe par l'application de la stratégie SDN3.

∴ Par utilisation de SDN1 et SDN2/ODM

La sélection dite « classique » valorise principalement le polymorphisme de type SNP et les variants alléliques pour les gènes d'intérêt. En ce sens, les SDN1 et SDN2/ODM ne devraient pas impacter fortement la structure génétique des nouvelles variétés car elles créent uniquement des conversions alléliques au niveau d'un gène cible (excepté en cas de remodelage des génomes).

Cependant ce polymorphisme de type SNP ou par variant allélique pourrait rapidement être étendu à la notion d'haplotypes d'intérêt par l'utilisation des techniques d'édition du génome, ceci en favorisant les mutations dans le même gène ou dans des gènes proches ou fortement liés. Dans le cas des espèces polyploïdes, cette stratégie permettrait d'obtenir plus rapidement les gènes favorables pour toutes les zones homéologues du génome et ainsi éviter les phénomènes de compensation suite à la modification d'une fonction donnée. Ces techniques pourraient également permettre l'édition de gènes en clusters, notamment pour certains gènes de résistance.

∴ Par utilisation de SDN3

A court terme, s'il y a eu pyramidage de gènes intéressants dans des zones peu recombinantes, ceci permettrait d'éviter les pertes de gènes par recombinaison au cours des cycles de sélection. A moyen/long terme, l'utilisation d'un matériel végétal obtenu par pyramidage dans des régions peu recombinantes pourrait rendre difficile la rupture du linkat et la séparation des gènes les uns des autres, sans réutiliser les SDNs. Augmenter les gènes d'intérêt dans des zones fortement recombinantes pourrait également être intéressante dans la mesure où cela permettrait rapidement de tester les interactions d'un gène avec différents fonds génétiques, et ainsi de pouvoir envisager plusieurs combinaisons de gènes afin de créer de la diversité génétique sans doute plus facilement utilisable par la suite dans d'autres schémas.

La deuxième opportunité permise par les SDNs de type 3 consiste à positionner les gènes d'intérêt non plus en fonction du potentiel recombinogène des régions génomiques, mais simplement par le choix des chromosomes. Cela permettrait une certaine « spécialisation » des chromosomes en fonction des familles de traits d'intérêt (résistance aux maladies, qualité...), ainsi que de cibler et d'introduire les gènes d'intérêt dans toutes les régions homéologues ou paralogues des génomes dupliqués (Endo et al., 2015).

De nombreuses études ont également montré l'intérêt du polymorphisme de type CNV (Copy Number Variation) dans le contrôle des traits agronomiques même si ces variants sont encore peu utilisés en amélioration des plantes. Les SDNs pourraient mimer ce polymorphisme de type CNV, par exemple, en empilant à un seul endroit du génome plusieurs copies du même gène d'intérêt (Andersen et al., 2015) potentiellement contrôlés par des promoteurs différents pour chacune des copies et ainsi garantir une expression du gène dans une gamme plus large de conditions environnementales.

4.2 Vision des professionnels de la semence

Avec les potentielles applications et avancées que les techniques d'édition du génome peuvent apporter à la sélection des plantes cultivées, on peut imaginer que ces techniques, si elles se voient exclues des réglementations OGM, entraînent une révolution du travail de création variétale à court terme. Cependant la mise en place de ces techniques dans les entreprises semencières de taille modeste nécessitera d'importants investissements aussi bien matériel qu'humain et l'acceptabilité de ces techniques par le grand public, quand bien même elles ne soient pas considérées comme OGM, pourraient empêcher ou freiner les semenciers plus modestes à investir dans ce domaine (Andersen et al., 2015; Malyska et al., 2016).

Cependant, les semenciers qui ne pourraient ou ne désireraient pas s'investir dans ces techniques pourraient tout de même en tirer un avantage certain en misant sur des marchés en développement dits « naturels » et « biologiques » ainsi qu'en communiquant sur le fait que leurs variétés n'ont été soumises à aucune intervention humaine sur leur génome. Dans ce contexte, la non utilisation, que ce soit pour des raisons financières ou idéologiques des techniques d'édition du génome pourraient favoriser les semenciers modestes n'ayant pas accès à ces techniques.

4.2.1 Les espoirs et les craintes des différents acteurs sur l'édition du génome

Avec la multitude d'utilisation possible des techniques d'édition du génome et en particulier celles faisant intervenir les nucléases dirigées, les différents acteurs de la filière semence s'intéressent grandement à ces techniques et leurs applications. La totalité des acteurs de la filière semence sont donc en veille sur ces techniques d'édition du génome, qu'ils envisagent ou

non de les appliquer dans leur propre entreprise. Ces techniques sont vues comme un outil supplémentaire dans la boîte à outils du sélectionneur afin de l'aider à parvenir à leurs objectifs finaux, outil qui ne remplacera en rien le travail classique de sélection.

La filière semence est notamment en attente et en veille des futures avancées technologiques de ces techniques ainsi que du statut réglementaire qui sera appliqué en Europe et en France pour l'utilisation de ces NBTs. En effet, l'ensemble des professionnels du secteur sont conscients que ces techniques sont encore jeunes et que les défis technologiques sont encore nombreux avant que la méthode soit pleinement efficace. De plus, le niveau de contraintes réglementaires appliquées à l'utilisation de ces techniques ainsi qu'à la commercialisation des produits créés par édition du génome dictera l'utilisation ou non de ces techniques à grande échelle dans les programmes de création variétale.

Dans l'attente de cette réglementation, les professionnels de la semence basent de grands espoirs dans l'application de ces techniques dans les programmes de sélection, mais également un certain nombre de craintes qui les conduisent pour certains à ne pas vouloir utiliser ces techniques dans leurs programmes, ceci quelle que soit la réglementation adoptée.

∴ Espoirs

- Diminution des délais de sélection

Les techniques d'édition du génome permettent d'imaginer de contrôler parfaitement les processus de sélection dans l'objectif d'orienter celle-ci et donc d'accélérer les processus. Si le sélectionneur connaît les caractères souhaités pour la nouvelle variété et que les déterminants génétiques contrôlant ces traits sont parfaitement connus, il est possible d'intégrer rapidement ces caractères souhaités dans les lignées parentales ou directement dans les variétés élites. Cette stratégie limite donc le nombre de rétrocroisements nécessaires à la création variétale pour introgresser les caractères d'intérêt, notamment pour les traits complexes multi-régulés. En sélection classique, l'introgession d'un allèle dans la variété souhaitée se fait en 5 ou 6 rétrocroisements (Lidder et Sonnino 2012).

Toujours dans l'objectif de diminuer le temps de création variétale, et ceci particulièrement pour les espèces ligneuses (Osakabe et al., 2016), il semble aisé par les techniques de SDNs de muter un gène codant pour le contrôle de la floraison. Cette stratégie permettrait de diminuer le délai avant floraison et ainsi diminuer le temps de création variétale.

- Apporter une valeur ajoutée aux variétés élites

Les professionnels de la semence ambitionnent avec ces nouvelles techniques d'édition du génome de créer des variétés dites « super élites » en apportant une valeur ajoutée à leurs obtentions élites. Nous pouvons ainsi imaginer la production de variétés enrichies en certains composés présentant un ou des caractères particulièrement intéressants pour les transformateurs et/ou les consommateurs (enrichies en vitamine, en antioxydants, pauvres en gluten par exemple) afin que les variétés ainsi produites soient encore plus attractives et compétitives. Ce type de caractères apportant une plus-value aux consommateurs pourrait contribuer à une meilleure acceptation des variétés dont le génome a été édité et soutenir leur développement. La production de molécules d'intérêt thérapeutique (médicaments, vaccins) ou de santé (vitamines, composés secondaires) pour l'alimentation humaine et animale ne sera, elle, identifiée comme objectif de sélection que s'il s'avère qu'elle présente une réelle valeur ajoutée par rapport aux autres voies de synthèse existantes (animaux, fermenteurs par exemple).

Les obtenteurs espèrent également pouvoir apporter à leurs variétés reconnues et auxquelles les consommateurs et/ou les transformateurs ont un attachement particulier, des traits agronomiques particuliers. L'ajout de ce nouveau trait à la variété considérée ne doit avoir aucun impact sur les autres caractéristiques de celle-ci afin que la modification soit transparente pour le consommateur et/ou le transformateur. Cette stratégie pourrait par exemple être entreprise dans le cas d'espèces fortement impactées par une maladie et permettant ainsi de limiter les dégâts sur les cultures et de diminuer les apports de produits phytopharmaceutiques sur la parcelle (Vincelli 2016). Cette approche SDN pour limiter l'apport de produits phytosanitaires est particulièrement attendue pour les espèces demandant un nombre important d'applications de produits phytochimiques comme par exemple la vigne sujette au mildiou (Brooke Borel, article de presse, 2016) ou le pommier sensible à la tavelure.

- Ouverture à de nouveaux traits

Ces techniques ouvrent également de nouveaux horizons pour les obtenteurs, laissant envisager de travailler des traits complexes ou difficiles à travailler en sélection classique. Nous pouvons noter par exemple :

- L'édition de gènes en tandem (Hua 2016). Les gènes fortement liés ne peuvent être ségrégués individuellement au cours des backcross traditionnels, rendant difficile le travail des traits qui y sont liés.
 - L'édition de traits multi-régulés. A l'heure actuelle, les gènes multi-régulés dits gènes complexes, sont difficilement sélectionnés, car chaque gène de cette régulation est en général ségrégué individuellement.
 - L'édition de gènes situés dans des zones peu ou non recombino-gènes. La recombinaison méiotique naturelle se fait principalement au niveau de « points chauds » de l'ADN. Les séquences situées en dehors de ces points chauds ont donc moins de chances de recombiner au moment de la méiose.
- Variétés sur liste VUIR : faciliter la création de variétés adaptées à un cahier des charges spécifique

Les variétés à usages industriels réservés (variétés VUIR) (*Arrêté du 30 août 1994 créant une liste de variétés à usages industriels réservés* 2016) présentent des caractéristiques technologiques originales qui répondent à des besoins industriels spécifiques pour lesquelles elles sont développées en exclusivité. L'utilisation des techniques d'édition du génome pour la création des variétés VUIR pourraient ainsi faciliter la sélection de plantes répondant au cahier des charges précis de l'industriel demandeur. Le temps de création variétale des variétés VUIR adaptées à un marché industriel spécifique pourra alors être diminué permettant d'accélérer le turn-over variétal et leurs performances industrielles.

∴ Craines

- Difficultés techniques actuelles

Les techniques d'édition du génome sont encore jeunes et, bien qu'elles promettent l'ouverture à un champ des possibles énormes dans le monde de la semence, elles sont toujours à l'état de POC pour un grand nombre d'espèces, ceci en particulier pour les éditions de type SDN2 et 3. Les semenciers se demandent donc légitimement si ces techniques seront rapidement suffisamment fiables pour justifier leur développement en routine pour l'ensemble des espèces qu'ils souhaitent travailler ou des traits qu'ils souhaitent développer.

- Ne pas être concurrentiels

Face aux grandes firmes semencières, une des craintes des entreprises plus modestes est de ne pas arriver assez vite sur le marché des plantes éditées et ainsi de ne pas arriver à être concurrentiels sur ce marché si celui-ci se développe.

Cette crainte est encore plus grande dans l'hypothèse que ces techniques soient considérées comme OGM sur le territoire français et européen et non considérées comme OGM au niveau international et notamment sur les territoires américains. Si ce cas de figure se présente, les semenciers possédant des marchés uniquement sur le sol français et européen craignent de perdre toute compétitivité face aux géants internationaux du secteur, cette inquiétude est encore plus forte si l'un de ces géants est détenteur de brevets clés pour l'utilisation d'une de ces techniques.

- Assimilation avec les plantes transgéniques

Dans le cas de figure où les variétés éditées ne sont pas assimilées OGM, il reste une incertitude sur l'acceptabilité du grand public pour ces nouvelles variétés. En effet, une difficulté particulière réside dans le fait que certaines modifications puissent être non détectables et donc que la technique d'obtention des plantes ne soit pas visible pour le consommateur. Ceci est de nature à engendrer une suspicion globale. L'assimilation des plantes éditées avec les plantes OGM, et la suspicion sur les autres pourraient diminuer leur confiance en l'industrie de la semence et ternir l'image que les consommateurs en ont (Ishii et Araki 2016). C'est pour cette raison que la grande majorité des semenciers sont ouverts à une information et une transparence sur les techniques d'obtentions des plantes qu'ils produisent.

4.2.2 Mise en place des techniques

Dans le cas où les obtenteurs désirent s'investir dans l'édition des génomes, la mise en place de ces techniques dépendra des entreprises considérées. En effet, cette mise en place est multifactorielle et sera différente d'un semencier à l'autre, selon leurs moyens financiers et techniques mais également en fonction de l'avancée des connaissances et l'amélioration de leur efficacité.

Les obtenteurs dits « grands semenciers » possédant déjà des laboratoires de culture *in vitro* et avec les connaissances nécessaires en transformation des plantes internaliseront et développeront la technique sans grande difficulté. Cependant, les obtenteurs plus modestes, s'ils

désirent se lancer dans la course à l'édition devront dans un premier temps soit faire appel à des entreprises de prestation de service ou spécialisées en génomique des plantes, soit s'associer afin de mutualiser leurs moyens.

En effet, bien que la technologie CRISPR/Cas9 soit moins chère et plus facile à mettre en place que les anciennes technologies SDNs, il n'en reste pas moins qu'un investissement conséquent en termes de laboratoire et également de ressources humaines avec l'expertise adéquate est indispensable au développement de ces techniques auprès des obtenteurs. Cependant, si ces techniques sont exclues des réglementations OGM en vigueur et que le potentiel de progrès qu'elles peuvent apporter est démontré, il est certain que les semenciers désireux de mettre en place ces techniques dans leurs schémas de sélection feront les investissements nécessaires à l'internalisation de ces techniques afin de rester concurrentiels face aux géants du secteur.

4.2.3 Modification des schémas de sélection

Dans les étapes précoces des schémas de sélection actuels, il est nécessaire de cribler rapidement un très large nombre d'accessions non encore fixées et issues de quelques croisements contrôlés. A ce jour les évolutions méthodologiques, et notamment la prédiction génomique ont permis de prédire les phénotypes d'une large gamme d'accessions sur la base de leur génotypage et ainsi de ne garder pour la suite du programme de sélection que les accessions les plus prometteuses. La valeur de la prédiction génomique dépend à la fois du déséquilibre de liaison existant entre les nombreux marqueurs et les mutations causales, et à la fois de la gamme de génotypes sur laquelle sont faites les prédictions phénotypiques en fonction des allèles présents dans le panel. Introduire de nouveaux allèles par SDN modifierait l'étendue de ce déséquilibre de liaison, mais modifierait également la fiabilité des prédictions phénotypiques qui ne pourront plus être déterminées par les équations de calibration utilisées aujourd'hui. A l'inverse, les outils d'édition du génome pourraient permettre d'améliorer les schémas de sélection assistée par marqueurs en permettant de cibler directement les variants présents dans les gènes d'intérêt et ainsi d'optimiser des schémas de rétrocroisement ou de sélection récurrente assistés par marqueurs.

En aval des schémas de sélection, et ce à très court terme, il est possible d'envisager les SDNs comme des outils pour « finir » les variétés déjà élites en leur ajoutant des traits qualitatifs désirés, ou bien en proposant une déclinaison de la même variété avec des éléments différents

permettant une personnalisation ou une adaptation spécifique de cette même variété pour différents marchés ou environnements.

Concernant la production de semences des variétés diffusées sous forme de graines, un certain nombre de freins observés lors des programmes de sélection conservatrice peuvent être levés. Les limites actuelles en production de semences sont soit liées à la multiplication de types variétaux particuliers comme les hybrides, soit liées à des problèmes de pollinisation, de production de graines ou de qualité sanitaire des semences. Les stérilités mâles sont aujourd'hui largement utilisées pour les espèces sélectionnées sous forme d'hybrides F1. Cependant leurs utilisations, en particulier pour les stérilités mâles cytoplasmiques (CMS) nécessitent des programmes spécifiques de conversion des futurs parents d'hybrides en lignées restauratrices et en lignées mâles stériles. On peut imaginer que le fait de pouvoir induire (et supprimer) la stérilité mâle à l'aide de promoteurs spécifiques pourrait permettre d'avoir des lignées mâles stériles induites uniquement lors de la production de semences. De plus, ces techniques d'édition du génome pourraient permettre également d'augmenter le nombre d'espèces pouvant se reproduire par apomixie, afin de favoriser la reproduction à l'identique du génotype maternel à l'ensemble des descendants.

4.3 Impact sur l'utilisation des ressources génétiques

Les ressources génétiques sont un enjeu fort de la sélection, puisqu'elles constituent le réservoir de diversité utilisé par les sélectionneurs. Les enjeux autour des ressources génétiques sont leur conservation et leur maintien, mais aussi leur caractérisation (fonctionnelle et moléculaire). Les SDNs permettent de créer de la diversité sans avoir besoin de « puiser » dans les ressources génétiques, et à ce titre les SDNs peuvent être considérées comme une alternative au recours aux ressources génétiques. Il semble en effet théoriquement plus efficace d'introduire directement l'allèle recherché dans un fond génétique élite en utilisant les SDNs que d'exploiter la diversité génétique présente dans des accessions très éloignées génétiquement du matériel en cours de sélection en réalisant de nombreuses étapes de rétrocroisement. Le développement des SDNs pourrait alors entraîner un arrêt de la conservation des ressources génétiques par les obtenteurs, et ainsi être un frein au maintien et à la conservation de la diversité génétique. Il est donc légitime de craindre que les collections de ressources génétiques soient remplacées par des séries de clones d'une même variété élite augmentée de différentes mutations apportées seules ou en combinaison.

Cependant, ces deux approches de la diversité ne sont pas si contradictoires et les biotechnologies peuvent apparaître comme complémentaires aux ressources génétiques (Lidder et Sonnino 2012). En effet, la notion de création de diversité par les SDNs répond à un besoin de diversité à court terme ; elle concerne uniquement des traits qui ont préalablement été identifiés comme des cibles et pour lesquels les principaux gènes sont déjà identifiés. Les SDNs permettent aussi d'améliorer l'utilisation de la diversité génétique, par exemple en introduisant de la diversité dans des régions du génome qui recombinent peu, ou bien en augmentant le nombre de gènes d'intérêt. Ces ressources génétiques peuvent également servir à l'identification de gènes homologues potentiellement éditables chez les espèces cultivées.

Les SDNs peuvent aussi être considérées comme un outil au service de la collecte, du maintien et de la gestion de la diversité présente au sein des collections de ressources génétiques. En effet, à ce jour certaines espèces disposent de peu de ressources génétiques disponibles principalement en raison de l'impossibilité ou de la difficulté de réalisation de croisements interspécifiques (le melon par exemple). Il est également envisageable de re-domestiquer une espèce cultivée à partir de son parent sauvage et ainsi de disposer de plus de diversité à l'ensemble des locus (hormis ceux impliqués dans le contrôle de la domestication), en limitant les effets de perte de diversité lors des goulots d'étranglement dus à la domestication.

4.4 Types variétaux et éditions du génome

Les principaux types variétaux cultivés sont les hybrides F1, les lignées pures, les clones ainsi que les variétés synthétiques. Actuellement le choix du type variétal se fait en fonction du mode de reproduction de l'espèce considérée (allogamie vs autogamie), de son niveau de ploïdie (diploïde vs polyploïde et en particulier autopolyploïde), de la capacité à maîtriser les flux polliniques, des stratégies de protection de la propriété intellectuelle des obtentions, et du coût de production de la semence.

Variétés à multiplication sans recombinaison génétique, permettant de s'assurer de la présence de l'évènement d'édition désiré dans la variété commercialisée :

- **Variétés lignées pures** : Ces variétés sont obtenues par autofécondation. Tous les individus de la variété porteront l'édition dans leur génome.

- **Variétés hybrides F1** : Les parents de l'hybride sont issus de lignées pures obtenues par autofécondation. Tous les individus hybrides F1 porteront les éditions des parents dans leur génome.
- **Variétés clonales et apomictiques** : Les variétés clonales et apomictiques sont reproduites par multiplication végétative, ainsi l'allèle ou les allèles d'intérêt introduits par les techniques d'édition du génome seront transmis à l'ensemble des semences/ou plants produits, sans perte de l'allèle édité. Cependant, ces variétés n'étant pas reproduites par voies sexuées, il semble plus délicat de ségréger les gènes codant les différentes composantes nécessaires à l'édition du génome si ceux-ci ont été stablement transformés dans le génome de la plante éditée.

Variétés à multiplication avec recombinaison génétique, ne permettant pas de s'assurer de la présence de l'édition désirée dans la variété commercialisée :

- **Variétés synthétiques (principalement développées pour des espèces allogames autopolyploïdes à fort niveau d'hétérozygotie)** : Ces variétés sont obtenues par des croisements entre différents parents hétérozygotes suivis de générations d'intercroisements entre les différents descendants. Ce schéma ne permet d'assurer la présence à une fréquence minimale de l'allèle d'intérêt dans la variété finale.

Les types variétaux *a priori* compatibles avec l'utilisation des techniques d'édition du génome (lignée pure, hybride F1 et clones) représentent la grande majorité des espèces cultivées à ce jour, ce qui permet d'envisager ces techniques à la fois pour des espèces à multiplication végétative comme les espèces pérennes (arboriculture et vigne) ou la pomme de terre, ainsi que pour la majorité des grandes cultures, et des plantes potagères et ornementales. Pour les espèces pérennes, il est cependant plus long de ségréger la nucléase après édition du fait de la longueur des cycles de reproduction (Peer et al., 2015).

4.5 Incidence sur les collaborations entre acteurs de la filière

Comme pour le développement de l'ensemble des techniques scientifiques et en particulier celles pouvant avoir un intérêt dans la production de produits commerciaux, le développement

des techniques d'édition du génome doit s'inscrire dans une vision collaborative des différents acteurs de la filière semence et création variétale.

4.5.1 Partenariats de recherche

D'un point de vue stratégique, le développement des NBTs nécessite de gros investissements à la fois pour acquérir les connaissances fondamentales nécessaires sur la physiologie des plantes, leur génome et les différentes régulations géniques, mais également pour acquérir et améliorer les connaissances techniques nécessaires aux expériences d'édition du génome, notamment dans la compréhension des génomes et en biologie cellulaire.

Ces différents développements doivent être entrepris pour chaque espèce et en particulier pour celles où peu de connaissances sont actuellement disponibles dans la littérature scientifique. Ce besoin pourra favoriser la création de programmes de recherche et de partenariats public/privé pour produire les connaissances nécessaires à la démocratisation des techniques d'édition du génome dans les programmes de sélection. A l'heure actuelle, le projet PIA GENIUS est le seul projet d'envergure au niveau français sur le développement de ces techniques d'édition du génome à l'aide des nucléases dirigées de type TALENs et CRISPR, impliquant des partenaires académiques et des partenaires privés.

∴ Production de connaissances sur les gènes, leurs fonctions et leurs interactions

Un des intérêts des techniques d'édition du génome est de pouvoir créer de la diversité allélique directement dans le gène d'intérêt sans intervenir sur le reste du génome. Cette approche dépend alors de l'acquisition de connaissances fondamentales sur les différents gènes et leurs interactions impliqués dans le contrôle des caractères et des gènes d'intérêt. Les outils d'édition du génome peuvent alors aider à la caractérisation de la fonction de ces gènes. Ces méthodes sont donc à la fois des outils d'aide à la création variétale, mais elles permettent également d'augmenter les connaissances sur le fonctionnement génétique et physiologique des plantes nécessaires pour leur valorisation agronomique. Ces techniques sont tout particulièrement intéressantes pour la compréhension des caractères très polygéniques dont l'expression dépend d'un grand nombre de gènes, et sans doute aussi d'un grand nombre d'interactions épistatiques et d'interaction avec l'environnement. Ces techniques peuvent également permettre la visualisation de gènes au niveau du génome grâce à la technologie Rainbow, permettant alors une plus grande compréhension de la localisation de séquences spécifiques (Ma et al., 2016).

L'identification et la caractérisation des génomes dépendront du développement de différentes disciplines scientifiques ; en effet, une première approche est de décomposer ces traits en traits plus élémentaires dont le déterminisme génétique sera sans doute moins complexe à appréhender. Dans ce cadre, les démarches de modélisation (physiologique, écophysio-logique, agronomique) sont un premier moyen pour identifier ces cibles. Les démarches de génétique quantitative (en particulier les approches de génétique d'association) permettent d'identifier les SNP associés aux mutations causales impliquées dans le contrôle des caractères polygéniques (ou de leurs composantes identifiées par exemple par modélisation). Les limites de ces approches résident dans leur résolution, pour pouvoir approcher l'ensemble des mutations causales contrôlant un caractère complexe, les effectifs de génotypes à cribler sont très importants. De plus ces modèles prennent encore mal en compte la part de variation due aux interactions épistatiques, d'hétérosis ou d'interaction avec l'environnement.

Le développement à la fois des démarches de modélisation de plus en plus fine du fonctionnement de la plante, ainsi que des démarches de génétique pour identifier les gènes impliqués dans les différents contrôles vont nécessiter la mise au point d'outils de phénotypage à haut débit et de plus en plus résolutifs afin d'accéder à des variables mesurées plus précisément, et sur un nombre élevé de plantes. En effet, aujourd'hui la résolution génomique est très élevée grâce aux efforts de séquençage et de re-séquençage, et la précision et le débit du phénotypage restent encore les étapes limitantes à cette caractérisation, bien que des plateformes haut-débit se mettent en place.

Aux vues des enjeux des NBTs dans les différents domaines liés à la biologie des plantes, il sera important de redéfinir les orientations stratégiques afin de s'intégrer dans un environnement de recherche où chacune des parties prenantes tirera des bénéfices de la collaboration.

∴ Production de connaissances sur les protocoles de transformation

Les méthodologies de biologie cellulaire comme l'haplodiploïdisation, la transformation, la régénération des plantules, le sauvetage d'embryons sont encore peu efficaces pour un grand nombre d'espèces travaillées, et leur chance de réussite dépend de l'espèce et du génotype. Des partenariats entre instituts publics et entreprises de sélection seront indispensables à la création et/ou l'optimisation de protocoles de transformation/régénération pour les différentes espèces cultivées ainsi que pour les principaux cultivars.

Si les techniques d'édition du génome doivent se démocratiser, il sera donc important de reprendre ou lancer des programmes de développement de protocoles de transformation/régénération comme cela a eu lieu dans les années 1990 avec le développement des techniques de transformation génétique. Le développement de ces techniques s'est par la suite restreint aux espèces majoritaires et aux espèces modèles du fait de la réglementation OGM qui en a limité le développement et donc l'intérêt pour le développement de tels protocoles sur les espèces mineures.

En plus d'augmenter l'intérêt des biotechnologies pour les programmes de sélection et de recherche fondamentale sur le fonctionnement du génome, les SDNs pourraient également permettre d'augmenter l'efficacité des protocoles de transformation / régénération en éditant les composants responsables de cette récalcitrance en biologie cellulaire (Fehér 2015), et ainsi rendre disponibles les SDNs pour un plus large spectre d'espèces et/ou de génotypes.

Sans ces développements techniques, les SDNs ne pourront être utilisées que sur un nombre restreint d'espèces, limitant alors l'accès au progrès génétique permis par ces techniques pour les espèces mineures ou difficilement transformables en l'état actuel des connaissances.

4.5.2 Ouverture du marché à de nouveaux acteurs

L'utilisation des techniques d'édition du génome en sélection nécessite de bien connaître le matériel génétique travaillé, et de maîtriser les techniques de biologie moléculaires et cellulaires mises en œuvre. Si le point d'équilibre entre les connaissances nécessaires sur ces deux aspects s'établit en faveur des connaissances portant sur les plantes, les obtenteurs présents actuellement sur le marché seront probablement toujours les acteurs au cœur de la création variétale demain. En revanche, s'il est plus important de maîtriser les techniques utilisées, au détriment des connaissances sur les plantes, on peut imaginer voir émerger de nouveaux acteurs spécialisés dans l'édition du génome sur diverses espèces, peu ou pas présents aujourd'hui sur la filière mais capables de se lancer dans l'édition des génomes à grande échelle.

Si on imagine une utilisation des techniques d'édition du génome sur l'environnement proche de la plante (microorganismes du sol par exemple) dans une optique de biocontrôle, les acteurs ayant déjà des connaissances dans le domaine de la protection des cultures pourraient voir leurs activités se développer.

5 Impacts de l'utilisation des techniques d'édition du génome sur le CTPS

5.1 Rappel du rôle du CTPS

Le CTPS (Comité Technique Permanent de la Sélection) est une instance auprès du Ministère en charge de l'Agriculture pour l'ensemble des questions relatives aux variétés, aux semences et aux plants.

Cette instance est paritaire, regroupant l'administration centrale, la recherche publique, les obtenteurs et semenciers, les utilisateurs des variétés et les utilisateurs des produits de récolte.

L'action du CTPS au sein de chacune de ses sections se concentre sur deux axes principaux.

- Il s'agit d'une part de définir les règlements techniques d'inscription pour chacune des espèces inscrites au catalogue. Pour les espèces où il y a une évaluation de la Valeur Agronomique, Technologique et Environnementale (VATE), le CTPS constitue un levier puissant d'orientation du progrès génétique, intégrant les attentes de l'ensemble des porteurs d'enjeux.
- Il s'agit d'autre part de proposer à l'inscription des variétés au catalogue national, sur la base des évaluations conduites sous le contrôle du GEVES, et en vérifiant que ces variétés respectent bien les règles de la DHS (Distinction, Homogénéité, Stabilité) et qu'elles répondent aux objectifs définis en terme de VATE.

Le CTPS apporte également au Ministère des avis sur différentes questions relatives aux variétés, semences et plants, au travers de l'action du Comité Scientifique, par des groupes thématiques dédiés, ou dans le cas des ressources génétiques par l'action de la nouvelle section du CTPS dédiée aux ressources génétiques.

Le CTPS constitue ainsi un levier extrêmement puissant pour renforcer le rôle de la création variétale dans l'émergence d'une agriculture et d'un agro-alimentaire français et européen performant, économique et respectueux de l'environnement.

L'action du CTPS et ses orientations sont aujourd'hui précisées par le plan SPAD (Semences, Plants et Agriculture Durable).

5.2 Impacts sur les évaluations DHS et VATE

Pour être inscrite au catalogue communautaire, une variété soumise à l'inscription se doit de respecter la condition DHS vis-à-vis des variétés déjà inscrites et VATE si l'espèce considérée fait partie des espèces de grande culture. Un équilibre s'est aujourd'hui créé autour de ces deux notions d'évaluation, et les techniques d'édition du génome par leur capacité à modifier des traits spécifiques rapidement pourraient bouleverser cet équilibre.

∴ Impacts sur les traits DHS

L'analyse de la DHS pour les variétés soumises à l'inscription repose sur l'analyse de caractères phénotypiques, la modification de certains caractères de la plante, en particulier ceux impactant l'itinéraire technique ou les qualités endogènes du produit final n'auront pas nécessairement de répercussions morphologiques associées. Si la variété éditée se trouve être une plante élite déjà inscrite ou une plante pré-élite déjà utilisée dans des schémas de sélection précédents, il est possible que la variété éditée ne remplisse pas les critères DHS de Distinction bien que le produit soit lui distinct. L'utilisation des techniques d'édition du génome dans les programmes de sélection pourrait alors conduire à une augmentation du nombre de variétés refusées en DHS et/ou de variétés essentiellement dérivées.

∴ Impacts sur les traits VATE

L'analyse des traits relatifs à la VATE est à l'heure actuelle réservée aux espèces de grandes cultures, excluant ainsi toutes les espèces potagères et ornementales. Cependant, si les outils d'édition du génome se développent dans les programmes de sélection, il faut s'attendre à une augmentation encore plus conséquente de la diversité des traits de type VATE pour l'ensemble des espèces végétales cultivées, y compris pour les espèces potagères et fruitières pour lesquels ces traits VATE ne sont pas valorisés avec les protocoles d'évaluation actuels.

5.3 Modification des stratégies d'évaluation

Analyser la question de l'évaluation des traits édités revient à considérer qu'il est plus important de considérer celui-ci plutôt que de se focaliser sur les procédés et techniques de mise en œuvre et sur l'importance d'en assurer la traçabilité. Cette question primordiale dans la problématique de l'évaluation des variétés produites par l'ensemble des techniques NBTs est une problématique principale qui fait également l'objet de réflexions au sein du Haut Conseil des Biotechnologies (HCB).

S'il était décidé d'étudier les variétés en fonction du produit final et des traits améliorés sans considération de la technique d'obtention, cela reviendrait à devoir établir une classification des différents traits améliorés ou améliorables :

On peut alors identifier trois types de traits :

- Les traits de type VATE (Valeur Agronomique, Technologique et Environnementale) ou DHS (Distinction, Homogénéité, Stabilité) et pour lesquels il existe une variabilité au sein du matériel variétal déjà inscrit sur le catalogue communautaire.

→ Pour ces traits, on peut imaginer que le travail du CTPS se focalisera sur l'analyse classique de la VATE et de la DHS.

- Les traits de type VATE ou DHS et pour lesquels il n'existe pas de variabilité au sein du matériel variétal déjà inscrit sur le catalogue communautaire. La méthode d'amélioration génétique a donc permis de modifier une ou des voie(s) métabolique(s) non modifiée(s) préalablement dans la diversité, pouvant induire un large panel de réponses biochimiques et physiologiques inconnues à ce jour.

→ Pour ces traits, on peut imaginer que le travail d'analyse du CTPS doit prendre en compte à la fois l'analyse du nouveau trait VATE ou DHS créé dans l'espèce considérée, mais également l'analyse détaillée des modifications induites si le trait n'existe pas au préalable dans la diversité de l'espèce dans le cadre des évaluations.

- Les traits ne faisant pas partie de la DHS ou de la VATE, mais qui interviennent dans les processus de création variétale et de production de semences.

→ Dans ce cas, le CTPS n'est pas concerné, sauf si la structure génétique des variétés s'en trouve modifiée et que ceci appelle une modification des règlements techniques.

Evaluer ainsi les variétés soumises par l'analyse des traits améliorés plutôt que sur la technique d'obtention du végétal permettrait d'éclairer sur les services et dys-services qu'offre le trait nouveau par rapport à l'offre actuelle inscrite au catalogue. Cette stratégie d'évaluation est d'autant plus intéressante quand il s'agit de traits pour lesquels il n'existe pas actuellement de variabilité génétique connue au sein des variétés figurant dans le catalogue communautaire.

L'évaluation des services et des dys-services qu'offre le trait nouveau pourrait être évalué à plusieurs échelles, de l'échelle de la molécule à celle de l'écosystème. Il est alors important de déterminer une norme afin de délimiter le périmètre spatial et temporel dans lequel on cherche à évaluer les dys-services que pourraient apporter la nouvelle variété et de même pour les services. Cette question devrait être envisagée dans le cadre d'une réflexion européenne ; en effet, l'analyse des services et dys-services se situe généralement dans une logique de prise en compte des différents impacts environnementaux et de santé possibles, qui devraient être précisés par des directives et règlements européens. Travailler sur l'étude des services et dys-services qu'amène le trait nouveau permettrait également d'offrir une meilleure transparence de l'ensemble de la filière.

L'analyse des services et dys-services rendus par une variété nouvelle apportant un caractère nouveau et déployée dans un système peut également conduire à des recommandations en matière de déploiement des variétés inscrites, en établissant *a priori* et en transparence un plan de suivi. Il est alors bien évident que ceci doit être construit dans le cadre du *continuum* inscription – post-inscription.

Dans le même temps, comme il est émis l'hypothèse que de nouveaux traits pourront être proposés régulièrement dans les variétés soumises au CTPS pour inscription de par l'utilisation des techniques SDNs, il conviendrait si cette stratégie est adoptée, de rechercher les moyens adéquats pour accélérer la mise au point des tests de caractérisation pour l'évaluation des services et dys-services rendus par le trait nouveau. Compte tenu de cette accélération de l'innovation, s'il s'avérait impossible de caractériser des traits nouveaux de manière appropriée, on pourrait aller vers des situations où un obtenteur mettrait en avant dans la démarche

commerciale ultérieure des traits nouveaux sans que le CTPS n'ait la capacité de les évaluer préalablement. Il est donc impératif que la capacité anticipatrice, présente au sein des sections CTPS, soit particulièrement sollicitée pour éviter des situations que l'on pourrait qualifier « orphelines d'évaluation ».

Cette stratégie d'évaluation des services et dys-services d'une variété nouvelle constituerait alors un changement important par rapport aux missions actuelles du CTPS et le rôle qu'en perçoivent les différents acteurs de la filière, mais elle permettrait de favoriser l'acceptabilité de la nouveauté biotechnologique par l'ensemble des acteurs. Tant pour cette obligation d'éclairer de façon indépendante l'utilisateur que pour l'évaluation dans une mise en système, l'accélération du processus d'amélioration génétique et l'élargissement des gammes de variation impliquent de renforcer le couplage entre d'une part les études relatives au processus d'inscription et d'autre part les études de post-inscription.

Ceci doit conduire à s'interroger sur la façon d'évaluer des services (et dys-services) rendus à l'échelle de l'individu, mais également à l'échelle du système de production. Il faut toutefois pouvoir maintenir le prix des évaluations dans une gamme relativement proche de celle des coûts actuels afin que ce changement de stratégie d'évaluation ne porte pas préjudice au déposant. Ceci pourrait se décliner d'une part en des études génériques, permettant de relier les services et dys-services d'une variété dans un système à des traits phénotypiques particuliers et d'autre part à renforcer l'usage de la modélisation informatique des variétés.

L'analyse des traits améliorés, et l'élargissement de l'offre variétale permise par les NBTs en général, peuvent alors être une occasion de revisiter la contribution possible de l'amélioration génétique à une évolution marquée des systèmes de production en mobilisant les principes de l'agro-écologie. C'est alors la diversité des options qui permettrait de réduire par exemple le risque d'une utilisation d'un unique herbicide à l'échelle d'une succession culturale ou d'un territoire agricole. Ainsi, face à un élargissement de l'offre variétale avec une diversité accrue de solutions génétiques, le CTPS, au service du Ministère de l'Agriculture, serait en mesure de renforcer le pouvoir d'orientation de l'inscription au catalogue, par une analyse des traits, plus que par la seule analyse et prise en compte du processus d'obtention. Ceci permet de créer une alternative crédible à la réglementation OGM.

On notera que lors du colloque de l'EAAP (European Association of Animal Production) à Belfast le 30 août 2016, le président de l'EFFAB, forum des sélectionneurs d'animaux d'élevage, a présenté une analyse juridique complète de l'utilisation de l'édition du génome en amélioration génétique des animaux d'élevage, et a également recommandé de considérer le produit et non la méthode d'obtention.

5.4 Impacts du changement des processus de sélection

Une des hypothèses posées par le développement des NBTs en général et des techniques d'édition du génome en particulier est celle d'une accélération des processus de sélection et de création variétale. Les délais de création accélérés signifient d'une part une accélération du progrès génétique pour des traits déjà étudiés, mais aussi une accélération du turn-over variétal avec des traits nouveaux ou des déterminismes nouveaux pour des traits connus. Ceci conduit à s'interroger sur la recherche d'une adéquation entre un besoin d'accélérer l'évaluation, mais en même temps d'étendre le champ des évaluations afin d'être en mesure de s'adapter à la nouvelle offre variétale. Pour résoudre ce paradoxe, l'utilisation d'une évaluation *in silico* d'une partie des traits ou de leurs conséquences pourrait être explorée afin de limiter l'impact sur les évaluations en champs.

Les outils d'édition du génome pourraient également modifier les structures des variétés ainsi que leurs modes de reproduction, on peut évoquer la possibilité de générer :

- De nouvelles stérilités mâles nucléo-cytoplasmiques, par édition de gènes mitochondriaux. Ceci pourrait conduire alors à la production de structures hybrides pour des espèces dont les variétés sont aujourd'hui des lignées ou des populations.
- L'utilisation de l'apomixie, permettant ainsi le maintien et la reproduction à l'identique de structures génétiques hétérozygotes.
- Chez les espèces pérennes, la recherche de génotypes à reproduction accélérée permettant de raccourcir la durée des cycles de création variétale.

Si la première de ces options a déjà été rencontrée dans l'évolution de l'amélioration variétale chez différentes espèces, les deux autres options n'ont encore jamais été rencontrées et demanderaient une prise en compte dans les protocoles d'évaluation et les règlements techniques considérés.

5.5 Changements des démarches évaluatives

L'évaluation de variétés issues des méthodes d'édition du génome demande de reconsidérer les démarches actuelles d'évaluation variétale, elles peuvent en effet impacter la structure des variétés ainsi que la considération nécessaire pour chaque caractère nouveau.

∴ Evaluation et génotypage

Les travaux d'évaluation variétale, à la fois de DHS et de VATE mobilisent fortement le phénotypage, avec une orientation accrue depuis quelques années vers le phénotypage à haut débit, où il est indispensable de maintenir l'équilibre entre rapidité et précision afin d'évaluer le plus grand nombre d'individus sans perdre en reproductibilité. Ces travaux d'évaluation variétale mobilisent également de façon croissante le génotypage moléculaire. Ce génotypage est utilisé ou pourrait être utilisé en prenant en considération deux axes principaux :

- la gestion des collections de référence.
- la détection de séries alléliques et l'identification des allèles existants pour un gène particulier.

Le génotypage mobilise principalement la présence de forts déséquilibres de liaison, ce qui permet d'utiliser des marqueurs moléculaires situés à distance du gène ou des gènes expliquant les différences entre deux échantillons.

Dans le cas de l'évaluation de matériels génétiques issus d'édition du génome et en particulier obtenues via les SDN 1 ou 2, le déséquilibre de liaison devient totalement non opérant. Il faut alors disposer de la signature exacte de la modification induite par édition pour pouvoir prendre en compte cette modification dans la recherche de différences entre les variétés, si la différence phénotypique présente un coût d'évaluation élevée (par exemple détecter des allèles différents pour un gène de résistance).

L'autre option consiste à mobiliser la traçabilité entre les différents génotypes et les géniteurs. Ceci est envisageable et permettrait de suivre l'usage de certains SDN1 dans le matériel soumis à l'inscription. Cependant cette traçabilité peut s'avérer défailante dans le cas de rachat de germplasm, ou bien après utilisation d'un parent issu de ressources génétiques plus anciennes.

Enfin, il pourrait s'avérer aisé avec les techniques d'édition du génome de changer les versions alléliques de différents gènes avec un impact phénotypique afin que l'obtention passe avec succès les épreuves DHS de l'inscription, ceci alors même que le reste du génome est fortement

similaire, voir identique à une variété déjà inscrite. Il est également possible qu'en éditant un seul gène impliqué dans des voies de régulation, la plante produite soit phénotypiquement très différente de la plante initiale et soit donc considérée comme « Distincte » avec les protocoles DHS actuel. Le génotypage serait alors un bon complément aux études DHS afin de détecter les variétés essentiellement dérivées distinctes phénotypiquement.

∴ Evaluation des services et dys-services de l'édition

Dans le cas où l'évaluation variétale ne soit pas dépendante de la méthode d'obtention, mais qu'elle porterait sur l'analyse des services et dys-services du trait nouveau, les études de type VATE et biochimiques devront être particulièrement considérées pour les espèces de grande culture, mais cette notion devra également être portée aux espèces potagères et fruitières.

La possibilité qu'offre les NBTs de favoriser le progrès génétique et l'adaptation des plantes aux différents stress biotiques et abiotiques, ainsi que de modifier leurs caractéristiques biochimiques font de la VATE une notion d'importance majeure dans l'étude des variétés. Les centres d'évaluation des variétés devront être en mesure d'évaluer l'impact des différents traits édités, ceci quel que soit le trait considéré ; la notion d'évaluation des services et dys-services sera probablement indispensable à toute évaluation.

Il est donc nécessaire de renforcer la capacité à évaluer les services et dys-services des nouveaux caractères apportés à de potentiels nouvelles structures variétales. Il faudra alors disposer d'une méthodologie d'élaboration de règlements techniques vis à vis de l'évaluation de caractères totalement innovants. Ce thème est abordé dans le plan SPAD, mais sans en préciser la démarche méthodologique. Le défi principal de l'élaboration d'une telle méthodologie d'évaluation vient de l'incertitude sur la diversité des traits nouveaux qu'il sera nécessaire d'évaluer ainsi que sur le nombre d'espèces susceptibles d'être concernées.

5.6 Non déclaration des éditions lors de l'inscription

Le matériel génétique innovant issu de l'utilisation des NBT en sélection des plantes présente la triple caractéristique de poser une question sur la propriété intellectuelle de l'obtention et du

trait modifié compte-tenu des investissements de recherche nécessaires à sa création, d'être non traçable et non détectable pour les obtentions de type SDN1 et pour SDN3 et dans une moindre mesure SDN2 (Ribarits et Bruller, 2014), de soulever des questions d'acceptabilité de la méthode auprès des consommateurs/ transformateurs.

Les obtenteurs pourraient potentiellement ne pas mentionner l'édition lors de l'inscription au catalogue, notamment si le statut réglementaire des obtentions éditées n'est pas statué rapidement, mais également si cette réglementation est trop restrictive et contraignante pour l'obteneur. Enfin, dans le cas où ces techniques d'édition soient rejetées par les utilisateurs, les obtenteurs pourraient désirer passer sous silence l'édition lors de l'inscription au catalogue.

Trois cas de figures sont possibles :

- 1) Passer sous silence les éditions ciblées par SDNs en assimilant la création du nouvel allèle à l'action de la mutagenèse naturelle ou induite.
- 2) Editer des variétés déjà inscrites au catalogue sans déclaration de la modification de la variété. Cette stratégie permettrait d'adapter les plantes produites à l'évolution des contraintes biotiques et abiotiques afin de leur offrir une plus grande durée d'exploitation. Cependant, sans déclaration de modification de la variété, il sera impossible de valoriser cette innovation.

Cependant ces deux stratégies ne protègent pas l'obteneur de l'appropriation par ces concurrents du ou des allèle(s) modifié(s) de par l'application de l'exemption du sélectionneur. Les bénéfices que pourraient tirer l'obteneur de ces stratégies pourraient alors être corrélés aux services en termes de VATE, et par conséquent en part de marché potentiel afin de rapidement rentabiliser le travail d'édition.

- 3) Déployer les stratégies faisant intervenir les techniques d'édition du génome aux variétés VUIR inscrites au catalogue et utilisées exclusivement dans une filière fermée de l'industrie agroalimentaire. La variété étant utilisée en circuit clos, sans vente intermédiaire, il sera aisé de l'éditer à façon.

Le choix de ne pas déclarer des traits édités au sein des nouvelles variétés dépendra donc de l'acceptation des obtentions éditées ainsi que du niveau de contraintes réglementaires

auxquelles elles seront soumises. Un nombre important de traits ayant déjà été édités par SDN1, il est possible que certains allèles édités aient déjà été apportés à de nouvelles variétés.

CONCLUSION

L'ensemble des nouvelles techniques d'amélioration des plantes, et en particulier les techniques d'édition du génome faisant intervenir les enzymes de type nucléases dirigées (SDNs) sont en train de révolutionner la vision actuelle de l'agriculture et des semences. Ces techniques dites SDNs permettent, en coopération avec les mécanismes naturels de réparation de l'ADN, de créer des modifications précises et ciblées dans les différents génomes végétaux. Ces modifications conduisent à la formation de mutations aléatoires par les mécanismes de jonction des extrémités non homologues (SDN1), de mutations prédéfinies par recombinaison homologue (SDN2) ou encore l'insertion ciblée de grandes séquences nucléotidiques par recombinaison homologue (SDN3).

De par ces différents mécanismes SDN, les techniques d'édition du génome par nucléases dirigées, et plus particulièrement celle faisant intervenir la nucléase CRISPR/Cas9 sont source d'un très grand nombre de publications depuis leur mise en lumière. Bien que la majorité des travaux publiés relèvent principalement de la preuve de concept du fait de la jeunesse de ces techniques, un grand nombre d'applications agronomiques ont été publiées ou brevetées laissant imaginer une modification de l'offre variétale du fait de leur utilisation dans les programmes de sélection. Cette offre variétale pourrait ainsi devenir plus diversifiée, adaptée et réactive vis-à-vis des modifications environnementales et des exigences commerciales.

Bien que les différents acteurs de la filière semences soient conscients des développements nécessaires avant l'application en routine de ces techniques d'édition du génome, ils sont en veille active sur les avancées techniques et réglementaires liées à ces techniques, ceci qu'ils souhaitent ou non s'investir dans ce domaine. En effet, ce sont les contraintes réglementaires ainsi que l'acceptation de ces techniques par le grand public qui dicteront la vitesse ainsi que l'ampleur des modifications de l'offre variétale permises par ces techniques.

Si les plantes issues de ces techniques de création variétale par édition du génome ne sont pas couvertes par la réglementation OGM, le CTPS se doit de se tenir prêt à étudier l'ensemble des variétés ainsi créées qui seront proposées à l'inscription.

Le comité scientifique du CTPS préconise 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. Cette évaluation est d'autant plus intéressante 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.

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 proposées 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.

Bien que des applications concrètes à ces techniques d'édition du génome en sélection des plantes aient déjà été publiées et/ou brevetées, il n'en reste pas moins que ces techniques d'édition du génome sont à l'heure actuelle toujours dans une voie d'exploration, cette voie laissant entrevoir la possibilité de fournir une offre variétale diversifiée, adaptée et réactive qui permettrait de s'orienter vers des productions toujours plus agro-écologiques. Il serait alors dommageable de casser cette dynamique de développement technologique ou de décider dès à présent d'exclure définitivement ces techniques d'amélioration.

BIBLIOGRAPHIE

- Abudayyeh, Omar O., Jonathan S. Gootenberg, Silvana Konermann, Julia Joung, Ian M. Slaymaker, David B. T. Cox, Sergey Shmakov, et al., 2016. « C2c2 Is a Single-Component Programmable RNA-Guided RNA-Targeting CRISPR Effector ». *Science*, juin, aaf5573. doi:10.1126/science.aaf5573.
- Ainley, William M., Lakshmi Sastry-Dent, Mary E. Welter, Michael G. Murray, Bryan Zeitler, Rainier Amora, David R. Corbin, et al., 2013. « Trait Stacking via Targeted Genome Editing ». *Plant Biotechnology Journal* 11 (9): 1126-34. doi:10.1111/pbi.12107.
- Ali, Zahir, Aala Abulfaraj, Ali Idris, Shakila Ali, Manal Tashkandi, et Magdy M. Mahfouz. 2015. « CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants ». *Genome Biology* 16: 238. doi:10.1186/s13059-015-0799-6.
- Altpeter, Fredy, et Je Jung. 2015. Édition D'un Génome Ciblé Pour Modifier La Biosynthèse De La Lignine Et La Composition De La Paroi Cellulaire. WO/2015/168158, issued 6 novembre 2015.
<https://patentscope.wipo.int/search/fr/detail.jsf?docId=WO2015168158&redirectedID=true>.
- Altpeter, Fredy, Nathan M. Springer, Laura E Bartley, Ann Blechl, Thomas P. Brutnell, Vitaly Citovsky, Liza Conrad, et al., 2016. « Advancing Crop Transformation in the Era of Genome Editing ». *The Plant Cell*, juin, tpc.00196.2016. doi:10.1105/tpc.16.00196.
- Andersen, Martin Marchman, Xavier Landes, Wen Xiang, Artem Anyshchenko, Janus Falhof, Jeppe Thulin Østerberg, Lene Irene Olsen, et al., 2015. « Feasibility of New Breeding Techniques for Organic Farming ». *Trends in Plant Science* 20 (7): 426-34. doi:10.1016/j.tplants.2015.04.011.
- 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.
- Baltes, Nicholas J., Aaron W. Hummel, Eva Konecna, Radim Cegan, Aaron N. Bruns, David M. Bisaro, et Daniel F. Voytas. 2015. « Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR-Cas prokaryotic immune system ». *Nature Plants* 1 (10): 15145. doi:10.1038/nplants.2015.145.
- Barak, Simon, Vanessa Ransbotyn, Matthew Hannah, et Christoph Verduyn. 2016. Procédés Et Moyens Pour Augmenter La Tolérance Au Stress Et La Biomasse Chez Des Plantes, issued 8 avril 2016.
<https://patentscope.wipo.int/search/fr/detail.jsf?docId=WO2016050512&recNum=14&maxRec=291&office=&prevFilter=&sortOption=Pub+Date+Desc&queryString=maize+crispr&tab=PCTDescription>.
- Barrangou, Rodolphe, Amanda Birmingham, Stefan Wiemann, Roderick L. Beijersbergen, Veit Hornung, et Anja van Brabant Smith. 2015. « Advances in CRISPR-Cas9 genome engineering: lessons learned from RNA interference ». *Nucleic Acids Research* 43 (7): 3407-19. doi:10.1093/nar/gkv226.
- Belhaj, Khaoula, Angela Chaparro-Garcia, Sophien Kamoun, et Vladimir Nekrasov. 2013. « Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system ». *Plant Methods* 9: 39. doi:10.1186/1746-4811-9-39.
- Ben-Shahar, Yehuda. 2014. « A piggyBac route to transgenic honeybees ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (24): 8708-9. doi:10.1073/pnas.1407876111.
- Bock, Ralph, et Volker Knoop, éd. 2012. *Genomics of Chloroplasts and Mitochondria*. Advances in Photosynthesis and Respiration 35. Dordrecht: Springer.

- Braff, Jonathan L., Stephanie J. Yaung, Kevin M. Esvelt, et George M. Church. 2016. « Characterization of Cas9–Guide RNA Orthologs ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2016 (5): pdb.top086793. doi:10.1101/pdb.top086793.
- Britt, Anne B. 1996. « Dna Damage and Repair in Plants ». *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47 (1): 75-100. doi:10.1146/annurev.arplant.47.1.75.
- Cardi, Teodoro, et C. Neal Stewart. 2016. « Progress of Targeted Genome Modification Approaches in Higher Plants ». *Plant Cell Reports* 35 (7): 1401-16. doi:10.1007/s00299-016-1975-1.
- Chandrasekaran, Jeyabharathy, Marina Brumin, Dalia Wolf, Diana Leibman, Chen Klap, Mali Pearlsman, Amir Sherman, Tzahi Arazi, et Amit Gal-On. 2016. « Development of Broad Virus Resistance in Non-Transgenic Cucumber Using CRISPR/Cas9 Technology: Virus Resistance in Cucumber Using CRISPR/Cas9 ». *Molecular Plant Pathology*, janvier, n/a - n/a. doi:10.1111/mpp.12375.
- Chan, Simon W.L. 2010. « Chromosome Engineering: Power Tools for Plant Genetics ». *Trends in Biotechnology* 28 (12): 605-10. doi:10.1016/j.tibtech.2010.09.002.
- Charpentier, Emmanuelle, et Jennifer A. Doudna. 2013. « Biotechnology: Rewriting a Genome ». *Nature* 495 (7439): 50-51. doi:10.1038/495050a.
- Chen, Kunling, et Caixia Gao. 2013. « TALENs: Customizable Molecular DNA Scissors for Genome Engineering of Plants ». *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao* 40 (6): 271-79. doi:10.1016/j.jgg.2013.03.009.
- Chen, Qiang, Huafang Lai, Jonathan Hurtado, Jake Stahnke, Kahlin Leuzinger, et Matthew Dent. 2013. « Agrofiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins ». *Advanced techniques in biology & medicine* 1 (1). doi:10.4172/atbm.1000103.
- Choi, Peter S., et Matthew Meyerson. 2014. « Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology ». *Nature communications* 5 (avril): 3728. doi:10.1038/ncomms4728.
- Cho, Seung Woo, Sojung Kim, Yongsu Kim, Jiyeon Kweon, Heon Seok Kim, Sangsu Bae, et Jin-Soo Kim. 2014. « Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases ». *Genome Research* 24 (1): 132-41. doi:10.1101/gr.162339.113.
- Cigan, Andrew Mark, Huirong Gao, Zhan-Bin Liu, Jasdeep Mutti, Dean Podlich, et Christopher Scelonge. 2016. Generation of Site-Specific-Integration Sites for Complex Trait Loci in Corn and Soybean, and Methods of Use, issued 18 mars 2016. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2016040030&recNum=1&tab=PCTClaims&maxRec=&office=&prevFilter=&sortOption=&queryString=>.
- Clasen, Benjamin M., Thomas J. Stoddard, Song Luo, Zachary L. Demorest, Jin Li, Frederic Cedrone, Redeat Tibebu, et al., 2016. « Improving Cold Storage and Processing Traits in Potato through Targeted Gene Knockout ». *Plant Biotechnology Journal* 14 (1): 169-76. doi:10.1111/pbi.12370.
- Clasen, Benjamin, Daniel F. Voytas, et Feng Zhang. 2015. Pommes De Terre À Teneur Réduite En Enzyme Gbss. WO/2015/193858, issued 24 décembre 2015. <https://patentscope.wipo.int/search/fr/detail.jsf?docId=WO2015193858&recNum=1&maxRec=&office=&prevFilter=&sortOption=&queryString=&tab=PCTDescription>.
- Davis, Anthony J., et David J. Chen. 2013. « DNA double strand break repair via non-homologous end-joining ». *Translational cancer research* 2 (3): 130-43. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02.
- D'Halluin, Kathleen, et Rene Ruitter. 2013. « Directed Genome Engineering for Genome Optimization ». *The International Journal of Developmental Biology* 57 (6-7-8): 621-27. doi:10.1387/ijdb.130217kd.
- D'Halluin, Kathleen, Chantal Vanderstraeten, Jolien Van Hulle, Joanna Rosolowska, Ilse Van Den Brande, Anouk Pennewaert, Kristel D'Hont, et al., 2013. « Targeted Molecular Trait

- Stacking in Cotton through Targeted Double-Strand Break Induction ». *Plant Biotechnology Journal* 11 (8): 933-41. doi:10.1111/pbi.12085.
- Díaz, Aurora, Meluleki Zikhali, Adrian S. Turner, Peter Isaac, et David A. Laurie. 2012. « Copy Number Variation Affecting the Photoperiod-B1 and Vernalization-A1 Genes Is Associated with Altered Flowering Time in Wheat (*Triticum Aestivum*) ». Édité par Samuel P. Hazen. *PLoS ONE* 7 (3): e33234. doi:10.1371/journal.pone.0033234.
- Dirks, Rob, Kees van Dun, C. Bastiaan de Snoo, Mark van den Berg, Cilia L. C. Lelivelt, William Voermans, Leo Woudenberg, et al., 2009. « Reverse Breeding: A Novel Breeding Approach Based on Engineered Meiosis ». *Plant Biotechnology Journal* 7 (9): 837-45. doi:10.1111/j.1467-7652.2009.00450.x.
- Djukanovic, Vesna, Spencer Charles Jones, Zhan-Bin Liu, Michael Lassner, et L. Aleksander Lyznik. 2016. Compositions and Methods for Producing Plants Resistant to Glyphosate Herbicide, issued 15 janvier 2016. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2016007347&redirectedID=true>.
- Dominguez, Antonia A., Wendell A. Lim, et Lei S. Qi. 2015. « Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (1): 5-15. doi:10.1038/nrm.2015.2.
- Duchateau, Philippe, et Claudia Bertonati. 2014. A Method for Producing Precise Dna Cleavage Using Cas9 Nickase Activity. WO/2014/191518, issued 5 décembre 2014. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2014191518&redirectedID=true>.
- Endo, M., M. Mikami, et S. Toki. 2015. « Multigene Knockout Utilizing Off-Target Mutations of the CRISPR/Cas9 System in Rice ». *Plant and Cell Physiology* 56 (1): 41-47. doi:10.1093/pcp/pcu154.
- Evers, Bastiaan, Katarzyna Jastrzebski, Jeroen P M Heijmans, Wipawadee Grenrum, Roderick L Beijersbergen, et Rene Bernards. 2016. « CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes ». *Nature Biotechnology* 34 (6): 631-33. doi:10.1038/nbt.3536.
- Fan, Di, Tingting Liu, Chaofeng Li, Bo Jiao, Shuang Li, Yishu Hou, et Keming Luo. 2015. « Efficient CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in Populus in the First Generation ». *Scientific Reports* 5 (juillet): 12217. doi:10.1038/srep12217.
- Fehér, Attila. 2015. « Somatic Embryogenesis — Stress-Induced Remodeling of Plant Cell Fate ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1849 (4): 385-402. doi:10.1016/j.bbagr.2014.07.005.
- Fu, Daolin, Cristobal Uauy, Ann Blechl, et Jorge Dubcovsky. 2007. « RNA Interference for Wheat Functional Gene Analysis ». *Transgenic Research* 16 (6): 689-701. doi:10.1007/s11248-007-9150-7.
- Gaj, Thomas, Charles A. Gersbach, et Carlos F. Barbas. 2013. « ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering ». *Trends in biotechnology* 31 (7): 397-405. doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.004.
- Grimsley, N., B. Hohn, T. Hohn, et R. Walden. 1986. « "Agroinfection," an Alternative Route for Viral Infection of Plants by Using the Ti Plasmid ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (10): 3282-86.
- Gupta, Manju, Asha M. Palta, Stephen Novak, Fyodor Urnov, et Sunita Gopalan. 2013. Engineered zinc finger proteins targeting 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase genes. US8399218 B2, filed 25 septembre 2008, et issued 19 mars 2013. <http://www.google.fr/patents/US8399218>.
- Hadidi, Ahmed, Ricardo Flores, Thierry Candresse, et Marina Barba. 2016. « Next-Generation Sequencing and Genome Editing in Plant Virology ». *Frontiers in Microbiology* 7 (août). doi:10.3389/fmicb.2016.01325.
- Hammond, Andrew, Roberto Galizi, Kyros Kyrou, Alekos Simoni, Carla Siniscalchi, Dimitris Katsanos, Matthew Gribble, et al., 2016. « A CRISPR-Cas9 Gene Drive System Targeting

- Female Reproduction in the Malaria Mosquito Vector *Anopheles Gambiae* ». *Nature Biotechnology* 34 (1): 78-83. doi:10.1038/nbt.3439.
- Haroldsen, Victor M., Mark W. Szczerba, Hakan Aktas, Javier Lopez-Baltazar, Mar Joseph Odias, Cecilia L. Chi-Ham, John M. Labavitch, Alan B. Bennett, et Ann L. T. Powell. 2012. « Mobility of Transgenic Nucleic Acids and Proteins within Grafted Rootstocks for Agricultural Improvement ». *Frontiers in plant science* 3 (mars). doi:10.3389/fpls.2012.00039.
- Haun, William, Andrew Coffman, Benjamin M. Clasen, Zachary L. Demorest, Anita Lowy, Erin Ray, Adam Retterath, et al., 2014. « Improved Soybean Oil Quality by Targeted Mutagenesis of the Fatty Acid Desaturase 2 Gene Family ». *Plant Biotechnology Journal* 12 (7): 934-40. doi:10.1111/pbi.12201.
- Hua, Jian. 2016. « Defining Roles of Tandemly Arrayed CBF Genes in Freezing Tolerance with New Genome Editing Tools ». *The New Phytologist* 212 (2): 301-2. doi:10.1111/nph.14183.
- Hummel, Aaron W., Daniel F. Voytas, et Nicholas Baltes. 2015. Conferring Resistance to Geminiviruses in Plants Using Crispr/Cas Systems, issued 3 avril 2015. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2015048707&redirectedID=true>.
- Igoucheva, Olga, Vitali Alexeev, et Kyonggeun Yoon. 2004. « Oligonucleotide-Directed Mutagenesis and Targeted Gene Correction: A Mechanistic Point of View ». *Current Molecular Medicine* 4 (5): 445-63.
- Iqbal, Zafar, Muhammad N. Sattar, et Muhammad Shafiq. 2016. « CRISPR/Cas9: A Tool to Circumscribe Cotton Leaf Curl Disease ». *Frontiers in Plant Science* 7 (avril). doi:10.3389/fpls.2016.00475.
- Ishii, Tetsuya, et Motoko Araki. 2016. « Consumer Acceptance of Food Crops Developed by Genome Editing ». *Plant Cell Reports* 35 (7): 1507-18. doi:10.1007/s00299-016-1974-2.
- Ito, Yasuhiro, Ayako Nishizawa-Yokoi, Masaki Endo, Masafumi Mikami, et Seiichi Toki. 2015. « CRISPR/Cas9-Mediated Mutagenesis of the RIN Locus That Regulates Tomato Fruit Ripening ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 467 (1): 76-82. doi:10.1016/j.bbrc.2015.09.117.
- Jacobs, Thomas B, Peter R LaFayette, Robert J Schmitz, et Wayne A Parrott. 2015. « Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9 ». *BMC Biotechnology* 15 (mars). doi:10.1186/s12896-015-0131-2.
- Jiang, Wenzhi, Huanbin Zhou, Honghao Bi, Michael Fromm, Bing Yang, et Donald P. Weeks. 2013. « Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice ». *Nucleic Acids Research* 41 (20): e188. doi:10.1093/nar/gkt780.
- 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.
- Ji, Xiang, Huawei Zhang, Yi Zhang, Yanpeng Wang, et Caixia Gao. 2015. « Establishing a CRISPR-Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants ». *Nature Plants* 1 (10): 15144. doi:10.1038/nplants.2015.144.
- Jo, Areum, Sangwoo Ham, Gum Hwa Lee, Yun-Il 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.
- Kabadi, Ami M., et Charles A. Gersbach. 2014. « Engineering Synthetic TALE and CRISPR/Cas9 Transcription Factors for Regulating Gene Expression ». *Methods* 69 (2): 188-97. doi:10.1016/j.ymeth.2014.06.014.

- Kearns, Nicola A., Hannah Pham, Barbara Tabak, Ryan M. Genga, Noah J. Silverstein, Manuel Garber, et René Maehr. 2015. « Functional Annotation of Native Enhancers with a Cas9-Histone Demethylase Fusion ». *Nature Methods* 12 (5): 401-3. doi:10.1038/nmeth.3325.
- 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.
- Komor, Alexis C., Yongjoo B. Kim, Michael S. Packer, John A. Zuris, et David R. Liu. 2016. « Programmable Editing of a Target Base in Genomic DNA without Double-Stranded DNA Cleavage ». *Nature* 533 (7603): 420-24. doi:10.1038/nature17946.
- Konig, Harald, Daniel Frank, Reinhard Heil, et Christopher Coenen. 2013. « Synthetic Genomics and Synthetic Biology Applications Between Hopes and Concerns ». *Current Genomics* 14 (1): 11-24. doi:10.2174/1389202911314010003.
- Kraft, Katerina, Sinje Geuer, Anja J. Will, Wing Lee Chan, Christina Paliou, Marina Borschiwer, Izabela Harabula, et al., 2015. « Deletions, Inversions, Duplications: Engineering of Structural Variants Using CRISPR/Cas in Mice ». *Cell Reports* 10 (5): 833-39. doi:10.1016/j.celrep.2015.01.016.
- Ledford, Heidi. 2015. « Alternative CRISPR system could improve genome editing ». *Nature* 526 (7571): 17-17. doi:10.1038/nature.2015.18432.
- Le Provost, Fabienne, Simon Lillico, Bruno Passet, Rachel Young, Bruce Whitelaw, et Jean-Luc Vilotte. 2010. « Zinc Finger Nuclease Technology Heralds a New Era in Mammalian Transgenesis ». *Trends in Biotechnology* 28 (3): 134-41. doi:10.1016/j.tibtech.2009.11.007.
- Liang, Zhen, Kang Zhang, Kunling Chen, et Caixia Gao. 2014. « Targeted Mutagenesis in *Zea mays* Using TALENs and the CRISPR/Cas System ». *Journal of Genetics and Genomics* 41 (2): 63-68. doi:10.1016/j.jgg.2013.12.001.
- Lidder, Preetmoninder, et Andrea Sonnino. 2012. « Biotechnologies for the Management of Genetic Resources for Food and Agriculture ». In *Advances in Genetics*, 78:1-167. Elsevier. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123943941000018>.
- Li, Guo-Min. 2008. « Mechanisms and Functions of DNA Mismatch Repair ». *Cell Research* 18 (1): 85-98. doi:10.1038/cr.2007.115.
- Li, Ting, Bo Liu, Martin H. Spalding, Donald P. Weeks, et Bing Yang. 2012. « High-Efficiency TALEN-Based Gene Editing Produces Disease-Resistant Rice ». *Nature Biotechnology* 30 (5): 390-92. doi:10.1038/nbt.2199.
- Liu, Kaiwen Ivy, Muhammad Nadzim Bin Ramli, Cheok Wei Ariel Woo, Yuanming Wang, Tianyun Zhao, Xiujun Zhang, Guo Rong Daniel Yim, et al., 2016. « A chemical-inducible CRISPR-Cas9 system for rapid control of genome editing ». *Nature Chemical Biology*, septembre. doi:10.1038/nchembio.2179.
- Lusser, Maria, et Howard V. Davies. 2013. « Comparative Regulatory Approaches for Groups of New Plant Breeding Techniques ». *New Biotechnology* 30 (5): 437-46. doi:10.1016/j.nbt.2013.02.004.
- Lusser, Maria, Claudia Parisi, Damien Plan, Emilio Rodriguez-Cerezo, Institute for Health and Consumer Protection, et Institute for Prospective Technological Studies. 2011. *New Plant Breeding Techniques State-of-the-Art and Prospects for Commercial Development*. Luxembourg: Publications Office. <http://dx.publications.europa.eu/10.2791/54761>.
- Ma, Hanhui, Li-Chun Tu, Ardalan Naseri, Maximiliaan Huisman, Shaojie Zhang, David Grunwald, et Thoru Pederson. 2016. « Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow ». *Nature Biotechnology* 34 (5): 528-30. doi:10.1038/nbt.3526.
- Malyska, Aleksandra, Robert Bolla, et Tomasz Twardowski. 2016. « The Role of Public Opinion in Shaping Trajectories of Agricultural Biotechnology ». *Trends in Biotechnology* 34 (7): 530-34. doi:10.1016/j.tibtech.2016.03.005.
- Manova, Vasilissa, et Damian Gruszka. 2015. « DNA damage and repair in plants – from models to crops ». *Frontiers in Plant Science* 6 (octobre). doi:10.3389/fpls.2015.00885.

- 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.
- Mathis, Luc, Daniel F. Voytas, Feng Zhang, et William Haun. 2014. Modifying Soybean Oil Composition Through Targeted Knockout of the Fad2-1a/1b Genes, issued 19 septembre 2014.
<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2014141147&redirectedID=true>.
- Mathis, Luc, Daniel Voytas, Jin Li, Feng Zhang, et Song Luo. 2014. Coupling Herbicide Resistance with Targeted Insertion of Transgenes in Plants, issued 9 mai 2014.
<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2014071006&redirectedID=true>.
- Mathis, Luc, Daniel Voytas, Feng Zhang, Benjamin Clasen, William Haun, et Thomas Stoddard. 2014. Potatoes with Reduced Cold-Induced Sweetening, issued 27 juin 2014.
<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2014096972&redirectedID=true>.
- McCallum, Claire M., Luca Comai, Elizabeth A. Greene, et Steven Henikoff. 2000. « Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) for Plant Functional Genomics ». *Plant Physiology* 123 (2): 439-42. doi:10.1104/pp.123.2.439.
- McDonald, James I., Hamza Celik, Lisa E. Rois, Gregory Fishberger, Tolison Fowler, Ryan Rees, Ashley Kramer, Andrew Martens, John R. Edwards, et Grant A. Challen. 2016. « Reprogrammable CRISPR/Cas9-Based System for Inducing Site-Specific DNA Methylation ». *Biology Open*, mai, bio.019067. doi:10.1242/bio.019067.
- McHale, L. K., W. J. Haun, W. W. Xu, P. B. Bhaskar, J. E. Anderson, D. L. Hyten, D. J. Gerhardt, J. A. Jeddelloh, et R. M. Stupar. 2012. « Structural Variants in the Soybean Genome Localize to Clusters of Biotic Stress-Response Genes ». *PLANT PHYSIOLOGY* 159 (4): 1295-1308. doi:10.1104/pp.112.194605.
- Mendenhall, Eric M., Kaylyn E. Williamson, Deepak Reyon, James Y. Zou, Oren Ram, J. Keith Joung, et Bradley E. Bernstein. 2013. « Locus-specific editing of histone modifications at endogenous enhancers using programmable TALE-LSD1 fusions ». *Nature biotechnology* 31 (12): 1133-36. doi:10.1038/nbt.2701.
- Michno, Jean-Michel, Xiaobo Wang, Junqi Liu, Shaun J Curtin, Thomas JY Kono, et Robert M Stupar. 2015. « CRISPR/Cas Mutagenesis of Soybean and Medicago Truncatula Using a New Web-Tool and a Modified Cas9 Enzyme ». *GM Crops & Food* 6 (4): 243-52. doi:10.1080/21645698.2015.1106063.
- Mikami, Masafumi, Seiichi Toki, et Masaki Endo. 2016. « Precision Targeted Mutagenesis via Cas9 Paired Nickases in Rice ». *Plant and Cell Physiology* 57 (5): 1058-68. doi:10.1093/pcp/pcw049.
- Morgens, David W, Richard M Deans, Amy Li, et Michael C Bassik. 2016. « Systematic comparison of CRISPR/Cas9 and RNAi screens for essential genes ». *Nature Biotechnology* 34 (6): 634-36. doi:10.1038/nbt.3567.
- Nelles, David A., Mark Y. Fang, Mitchell R. O'Connell, Jia L. Xu, Sebastian J. Markmiller, Jennifer A. Doudna, et Gene W. Yeo. 2016. « Programmable RNA Tracking in Live Cells with CRISPR/Cas9 ». *Cell* 165 (2): 488-96. doi:10.1016/j.cell.2016.02.054.
- 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.
- O'Connell, Mitchell R., Benjamin L. Oakes, Samuel H. Sternberg, Alexandra East-Seletsky, Matias Kaplan, et Jennifer A. Doudna. 2014. « Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9 ». *Nature* 516 (7530): 263-66. doi:10.1038/nature13769.
- 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.
- Osakabe, Y., et K. Osakabe. 2015. « Genome Editing with Engineered Nucleases in Plants ». *Plant and Cell Physiology* 56 (3): 389-400. doi:10.1093/pcp/pcu170.
- Osakabe, Yuriko, Shigeo S. Sugano, et Keishi Osakabe. 2016. « Genome Engineering of Woody Plants: Past, Present and Future ». *Journal of Wood Science* 62 (3): 217-25. doi:10.1007/s10086-016-1548-5.
- Ossowski, S., K. Schneeberger, J. I. Lucas-Lledo, N. Warthmann, R. M. Clark, R. G. Shaw, D. Weigel, et M. Lynch. 2010. « The Rate and Molecular Spectrum of Spontaneous Mutations in *Arabidopsis thaliana* ». *Science* 327 (5961): 92-94. doi:10.1126/science.1180677.
- Palmgren, Michael G., Anna Kristina Edenbrandt, Suzanne Elizabeth Vedel, Martin Marchman Andersen, Xavier Landes, Jeppe Thulin Østerberg, Janus Falhof, et al., 2015. « Are We Ready for Back-to-Nature Crop Breeding? » *Trends in Plant Science* 20 (3): 155-64. doi:10.1016/j.tplants.2014.11.003.
- Peciña, Ana, Kathleen N. Smith, Christine Mézard, Hajime Murakami, Kunihiro Ohta, et Alain Nicolas. 2002. « Targeted Stimulation of Meiotic Recombination ». *Cell* 111 (2): 173-84. doi:10.1016/S0092-8674(02)01002-4.
- Peer, Reut, Gil Rivlin, Sara Golobovitch, Moshe Lapidot, Amit Gal-On, Alexander Vainstein, Tzvi Tzfira, et Moshe A. Flaishman. 2015. « Targeted Mutagenesis Using Zinc-Finger Nucleases in Perennial Fruit Trees ». *Planta* 241 (4): 941-51. doi:10.1007/s00425-014-2224-x.
- Pereira, Sofia I. A., Helena Moreira, Konstantinos Argyras, Paula M. L. Castro, et Ana P. G. C. Marques. 2016. « Promotion of Sunflower Growth under Saline Water Irrigation by the Inoculation of Beneficial Microorganisms ». *Applied Soil Ecology* 105 (septembre): 36-47. doi:10.1016/j.apsoil.2016.03.015.
- Petolino, Joseph F. 2015. « Genome Editing in Plants via Designed Zinc Finger Nucleases ». *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 51 (1): 1-8. doi:10.1007/s11627-015-9663-3.
- Piatek, Agnieszka, Zahir Ali, Hatoon Baazim, Lixin Li, Aala Abulfaraj, Sahar Al-Shareef, Mustapha Aouida, et Magdy M. Mahfouz. 2015. « RNA-Guided Transcriptional Regulation in *Planta* via Synthetic dCas9-Based Transcription Factors ». *Plant Biotechnology Journal* 13 (4): 578-89. doi:10.1111/pbi.12284.
- Puchta, H., B Dujon, et B Hohn. 1993. « Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. » *Nucleic Acids Research* 21 (22): 5034-40.
- Puchta, H., B. Dujon, et B. Hohn. 1996. « Two Different but Related Mechanisms Are Used in Plants for the Repair of Genomic Double-Strand Breaks by Homologous Recombination ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (10): 5055-60.
- Qi, Yiping, Yong Zhang, Feng Zhang, Joshua A. Baller, Spencer C. Cleland, Yungil Ryu, Colby G. Starker, et Daniel F. Voytas. 2013. « Increasing Frequencies of Site-Specific Mutagenesis and Gene Targeting in *Arabidopsis* by Manipulating DNA Repair Pathways ». *Genome Research* 23 (3): 547-54. doi:10.1101/gr.145557.112.
- 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.
- Raab, R. Michael, Michael Lanahan, Christopher Bonin, et Oleg Bougri. 2016. *Plantes Avec Des Gènes Endogènes Modifiés*, issued 8 avril 2016. <https://patentscope.wipo.int/search/fr/detail.jsf?docId=W02016054039&recNum=17&office=&queryString=maize+crispr&prevFilter=&sortOption=Pub+Date+Desc&maxRec=291>.

- 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.
- 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.
- Ravinder, Namritha, Korbinian Heil, Yizhu Guo, Xiquan Liang, et Robert Potter. 2016. Crispr Oligonucleotides and Gene Editing, issued 15 avril 2016. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2016057951&recNum=8&maxRec=433&office=&prevFilter=&sortOption=Pub+Date+Desc&queryString=FP%3A%28crispr%29&tab=PCTDescription>.
- Ren, Chong, Xianju Liu, Zhan Zhang, Yi Wang, Wei Duan, Shaohua Li, et Zhenchang Liang. 2016. « CRISPR/Cas9-Mediated Efficient Targeted Mutagenesis in Chardonnay (*Vitis Vinifera* L.) ». *Scientific Reports* 6: 32289. doi:10.1038/srep32289.
- Ribarits Alexandra, Werner Brüller. 2014. « Use of Novel Techniques in Plant Breeding and Practical Consequences Concerning Detection, Traceability, Labeling, and Risk Assessment ». décembre 23. <http://www.agbioforum.org/v17n3/v17n3a03-ribarits.htm>.
- Sauer, Noel J., Javier Narváez-Vásquez, Jerry Mozoruk, Ryan B. Miller, Zachary J. Warburg, Melody J. Woodward, Yohannes A. Mihiret, et al., 2016. « Oligonucleotide-Mediated Genome Editing Provides Precision and Function to Engineered Nucleases and Antibiotics in Plants ». *Plant Physiology* 170 (4): 1917-28. doi:10.1104/pp.15.01696.
- Saxena, R. K., D. Edwards, et R. K. Varshney. 2014. « Structural Variations in Plant Genomes ». *Briefings in Functional Genomics* 13 (4): 296-307. doi:10.1093/bfgp/elu016.
- Schatlowski, N., P. Wolff, J. Santos-Gonzalez, V. Schoft, A. Siretskiy, R. Scott, H. Tamaru, et C. Kohler. 2014. « Hypomethylated Pollen Bypasses the Interploidy Hybridization Barrier in Arabidopsis ». *The Plant Cell* 26 (9): 3556-68. doi:10.1105/tpc.114.130120.
- Schmitz, Robert J., et Joseph R. Ecker. 2012. « Epigenetic and epigenomic variation in Arabidopsis thaliana ». *Trends in plant science* 17 (3): 149-54. doi:10.1016/j.tplants.2012.01.001.
- Schöb, H., C. Kunz, et F. Meins. 1997. « Silencing of Transgenes Introduced into Leaves by Agroinfiltration: A Simple, Rapid Method for Investigating Sequence Requirements for Gene Silencing ». *Molecular & General Genetics: MGG* 256 (5): 581-85.
- Schouten, Henk J, Frans A Krens, et Evert Jacobsen. 2006. « Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants: International regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis ». *EMBO reports* 7 (8): 750-53. doi:10.1038/sj.embor.7400769.
- Shan, Qiwei, Yi Zhang, Kunling Chen, Kang Zhang, et Caixia Gao. 2015. « Creation of Fragrant Rice by Targeted Knockout of the *OsBADH2* Gene Using TALEN Technology ». *Plant Biotechnology Journal* 13 (6): 791-800. doi:10.1111/pbi.12312.
- Slaymaker, Ian M., Linyi Gao, Bernd Zetsche, David A. Scott, Winston X. Yan, et Feng Zhang. 2016. « Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity ». *Science (New York, N.Y.)* 351 (6268): 84-88. doi:10.1126/science.aad5227.
- Smolka, Anders, Xue-Yuan Li, Catrin Heikelt, Margareta Welander, et Li-Hua Zhu. 2010. « Effects of Transgenic Rootstocks on Growth and Development of Non-Transgenic Scion Cultivars in Apple ». *Transgenic Research* 19 (6): 933-48. doi:10.1007/s11248-010-9370-0.
- 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.
- Stoddard, Barry L. 2005. « Homing Endonuclease Structure and Function ». *Quarterly Reviews of Biophysics* 38 (1): 49-95. doi:10.1017/S0033583505004063.

- Sun, Yongwei, Xin Zhang, Chuanyin Wu, Yubing He, Youzhi Ma, Han Hou, Xiuping Guo, Wenming Du, Yunde Zhao, et Lanqin Xia. 2016. « Engineering Herbicide-Resistant Rice Plants through CRISPR/Cas9-Mediated Homologous Recombination of Acetolactate Synthase ». *Molecular Plant* 9 (4): 628-31. doi:10.1016/j.molp.2016.01.001.
- Svitashev, Sergei, Joshua K. Young, Christine Schwartz, Huirong Gao, S. Carl Falco, et A. Mark Cigan. 2015. « Targeted Mutagenesis, Precise Gene Editing, and Site-Specific Gene Insertion in Maize Using Cas9 and Guide RNA[OPEN] ». *Plant Physiology* 169 (2): 931-45. doi:10.1104/pp.15.00793.
- 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.
- Takeda, Shin, et Makoto Matsuoka. 2008. « Genetic Approaches to Crop Improvement: Responding to Environmental and Population Changes ». *Nature Reviews Genetics* 9 (6): 444-57. doi:10.1038/nrg2342.
- Townsend, Jeffrey A., David A. Wright, Ronnie J. Winfrey, Fengli Fu, Morgan L. Maeder, J. Keith Joung, et Daniel F. Voytas. 2009. « High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases ». *Nature* 459 (7245): 442-45. doi:10.1038/nature07845.
- Tsai, Shengdar Q., Zongli Zheng, Nhu T. Nguyen, Matthew Liebers, Ved V. Topkar, Vishal Thapar, Nicolas Wyvekens, et al., 2015. « GUIDE-Seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases ». *Nature biotechnology* 33 (2): 187-97. doi:10.1038/nbt.3117.
- Urnov, Fyodor D., Edward J. Rebar, Michael C. Holmes, H. Steve Zhang, et Philip D. Gregory. 2010. « Genome editing with engineered zinc finger nucleases ». *Nature Reviews Genetics* 11 (9): 636-46. doi:10.1038/nrg2842.
- Varshney, Rajeev K., Jean-Marcel Ribaut, Edward S. Buckler, Roberto Tuberosa, J. Antoni Rafalski, et Peter Langridge. 2012. « Can Genomics Boost Productivity of Orphan Crops? » *Nature Biotechnology* 30 (12): 1172-76. doi:10.1038/nbt.2440.
- Vincelli, Paul. 2016. « Genetic Engineering and Sustainable Crop Disease Management: Opportunities for Case-by-Case Decision-Making ». *Sustainability* 8 (5): 495. doi:10.3390/su8050495.
- Vojta, Aleksandar, Paula Dobrinić, Vanja Tadić, Luka Bočkor, Petra Korać, Boris Julg, Marija Klasić, et Vlatka Zoldoš. 2016. « Repurposing the CRISPR-Cas9 System for Targeted DNA Methylation ». *Nucleic Acids Research*, mars, gkw159. doi:10.1093/nar/gkw159.
- Voytas, Daniel, Feng Zhang, Jin Li, Thomas Stoddard, et Song Luo. 2014. Methods for Non-Transgenic Genome Editing in Plants, issued 19 décembre 2014. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=W02014199358&recNum=1&maxRec=&office=&prevFilter=&sortOption=&queryString=&tab=PCTDescription>.
- Wang, Yanpeng, Xi Cheng, Qiwei Shan, Yi Zhang, Jinxing Liu, Caixia Gao, et Jin-Long Qiu. 2014. « Simultaneous Editing of Three Homoeoalleles in Hexaploid Bread Wheat Confers Heritable Resistance to Powdery Mildew ». *Nature Biotechnology* 32 (9): 947-51. doi:10.1038/nbt.2969.
- Waterworth, Wanda M., Georgina E. Drury, Clifford M. Bray, et Christopher E. West. 2011. « Repairing Breaks in the Plant Genome: The Importance of Keeping It Together ». *New Phytologist* 192 (4): 805-22. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03926.x.
- Weigel, Detlef, et Vincent Colot. 2012. « Epialleles in plant evolution ». *Genome Biology* 13 (10): 249. doi:10.1186/gb-2012-13-10-249.
- Wijnker, Erik, Kees van Dun, C Bastiaan de Snoo, Cilia L C Lelivelt, Joost J B Keurentjes, Nazatul Shima Naharudin, Maruthachalam Ravi, Simon W L Chan, Hans de Jong, et Rob Dirks. 2012. « Reverse breeding in Arabidopsis thaliana generates homozygous parental lines from a heterozygous plant ». *Nature Genetics* 44 (4): 467-70. doi:10.1038/ng.2203.

- Xie, Kabin, Bastian Minkenberg, et Yinong Yang. 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.
- Xiong, Jin-Song, Jing Ding, et Yi Li. 2015. « Genome-editing technologies and their potential application in horticultural crop breeding ». *Horticulture Research* 2 (mai): 15019. doi:10.1038/hortres.2015.19.
- Xu, Rongfang, Yachun Yang, Ruiying Qin, Hao Li, Chunhong Qiu, Li Li, Pengcheng Wei, et Jianbo Yang. 2016. « Rapid Improvement of Grain Weight via Highly Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Multiplex Genome Editing in Rice ». *Journal of Genetics and Genomics*, juillet. doi:10.1016/j.jgg.2016.07.003.
- Xu, Xingxing, Yonghui Tao, Xiaobo Gao, Lei Zhang, Xufang Li, Weiguo Zou, Kangcheng Ruan, Feng Wang, Guo-liang Xu, et Ronggui Hu. 2016. « A CRISPR-based approach for targeted DNA demethylation ». *Cell Discovery* 2 (mai): 16009. doi:10.1038/celldisc.2016.9.
- Yang, Yinong, et Kabin Xie. 2014. Gene Targeting and Genetic Modification of Plants Via Rna-Guided Genome Editing, issued 5 décembre 2014. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2014194190&recNum=2&office=&queryString=FP%3A%28GENE+TARGETING+AND+GENETIC+MODIFICATION+OF+PLANTS+VIA+RNA-GUIDED+GENOME+EDITING%29&prevFilter=&sortOption=Pub+Date+Desc&maxRec=2>.
- Yan, Wenhao, Dijun Chen, et Kerstin Kaufmann. 2016. « Efficient multiplex mutagenesis by RNA-guided Cas9 and its use in the characterization of regulatory elements in the AGAMOUS gene ». *Plant Methods* 12: 23. doi:10.1186/s13007-016-0125-7.
- Zhai, Shengnan, Xianchun Xia, et Zhonghu He. 2016. « Carotenoids in Staple Cereals: Metabolism, Regulation, and Genetic Manipulation ». *Frontiers in Plant Science* 7 (août). doi:10.3389/fpls.2016.01197.
- Zhao, Chunzhao, Zhengjing Zhang, Shaojun Xie, Tong Si, Yuanya Li, et Jian-Kang Zhu. 2016. « Mutational Evidence for the Critical Role of *CBF* Genes in Cold Acclimation in Arabidopsis ». *Plant Physiology*, juin. doi:10.1104/pp.16.00533.
- Zhou, Huanbin, Bo Liu, Donald P. Weeks, Martin H. Spalding, et Bing Yang. 2014. « Large Chromosomal Deletions and Heritable Small Genetic Changes Induced by CRISPR/Cas9 in Rice ». *Nucleic Acids Research* 42 (17): 10903-14. doi:10.1093/nar/gku806.
- Zhou, Junhui, Zhao Peng, Juying Long, Davide Sosso, Bo Liu, Joon-Seob Eom, Sheng Huang, et al., 2015. « Gene Targeting by the TAL Effector PthXo2 Reveals Cryptic Resistance Gene for Bacterial Blight of Rice ». *The Plant Journal* 82 (4): 632-43. doi:10.1111/tpj.12838.

WEBOGRAPHIE ET AUTRES REFERENCES

- Arrêté du 30 août 1994 créant une liste de variétés à usages industriels réservés.* 2016. Consulté le août 3.
- Directive 2001/18/CE du Parlement européen et du Conseil du 12 mars 2001 relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement et abrogeant la directive 90/220/CEE du Conseil - Déclaration de la Commission.* 2016. Consulté le août 3.
- Haut Conseil des Biotechnologies. 2016. « « NOUVELLES TECHNIQUES » - « NEW PLANT BREEDING TECHNIQUES » Première étape de la réflexion du HCB - Introduction générale ». Consulté le octobre 7. http://www.hautconseildesbiotechnologies.fr/fr/system/files/file_fields/2016/03/30/cs_1.pdf.
- « Le plan d'action « Semences et agriculture durable » | Alim'agri ». 2016. Consulté le septembre 14. <http://agriculture.gouv.fr/le-plan-daction-semences-et-agriculture-durable>.
- « Transgéniques : pour des choix responsables ». 2016. Consulté le octobre 5. <https://www.senat.fr/rap/r97-440/r97-44011.html>.
- « Rapport d'évaluation du plan semences et agriculture durables ». 2016. Consulté le septembre 14. http://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/cgaaer_15030_cgedd_010164-01_2015_rapport.pdf.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Liste des interlocuteurs

ANNEXE 2 : Fiches « Nouvelles techniques » issues de la première étape de réflexion du HCB

Liste des personnes ayant accepté de contribuer à cette étude et société ou organisation représentées:

- 25 personnes ont été sollicitées et 15 ont accepté de répondre à notre requête :

Nom	Société
E. Chevreau	Inra Angers
P. Rogowsky	ENS Lyon
B. Desprez	Florimond Desprez
E. Bonnel	Germicopa
V. Rimbert	Limagrain
J.P. Martinant	Limagrain
P. Perez	Limagrain
A. Gaillard	Maïsadour
C. Tabel	RAGT
Obtenteur X	X
Obtenteur Z	Z
O. Lucas	UFS
E. Lesprit	UFS
B. Valluis	ANMF
D. Theobald	OCVV

FICHE NOUVELLES TECHNIQUES

ZINC FINGER NUCLEASE

Présentation générale de la technique (Grand public)

Le système ZFN (Zinc Finger Nuclease) est un outil de coupure ciblée, de l'ADN d'un organisme. Ces « ciseaux moléculaires » reconnaissent et coupent une séquence précise et généralement unique de l'ADN. L'objectif de ce type de coupure ciblée est d'obtenir :

- L'inactivation d'un gène : pour en étudier la fonction par exemple.
- La mutation ponctuelle d'un gène, pour introduire une forme différente de ce gène : changer la séquence d'un gène présent dans une variété avec celui d'une autre en conservant les propriétés de cette variété.
- La substitution d'une séquence génétique par une autre : objectif identique au précédent mais avec plusieurs changements dans le même gène.
- L'insertion à un endroit précis du génome d'un gène d'intérêt : pour, par exemple, réaliser une transgénèse en choisissant le site génétique où le transgène est intégré.

L'intérêt du système vient de ce qu'il est possible, par le biais d'une ingénierie protéique, de « programmer » la protéine pour qu'elle reconnaisse une séquence choisie. Le site à reconnaître sur l'ADN oriente le choix d'une séquence spécifique donnée à une structure protéique dite « en doigt de zinc ». La protéine fabriquée comporte aussi un domaine de coupure de l'ADN (nucléase).

La stratégie d'utilisation des ZFN est robuste mais nécessite une mise au point relativement longue et complexe, et cette technique a un avenir incertain depuis l'émergence des TALEN puis du système CRISPR/Cas9.

Principe et fonctionnement au niveau cellulaire et moléculaire.

La technologie de mutagenèse dirigée par les méganucléases³² repose sur l'interaction spécifique d'une protéine ou d'un complexe moléculaire caractérisé par une activité d'endonucléase avec une séquence nucléotidique d'ADN présélectionnée par l'utilisateur. Le clivage de l'ADN ciblé active une cascade de réparation de type Non Homologous End Joining (NHEJ) (Kim et al., 1996) induisant des modifications de l'ADN, ou de type Homologous Recombination (HR) si une séquence d'ADN modèle est transférée concomitamment à la nucléase (Moehle et al., 2007). C'est sur ce principe général que reposent les trois techniques actuelles de mutagenèse dirigée utilisant les nucléases de type ZFN, TALEN et CRISPR/Cas9.

Les ZFN sont des protéines chimériques composées du domaine de clivage, le plus souvent celui de l'endonucléase bactérienne Fok1, fusionné en amino-terminal à 3 à 6 motifs « en doigt de zinc », ou motifs Zinc Finger, de type Cys₂His₂ (Kim et al., 1996).

Le domaine catalytique de l'endonucléase clive l'ADN de manière non spécifique mais son activité dépend d'une homo-dimérisation.

Les motifs « en doigt de zinc » sont des structures protéiques qui interagissent avec un triplet de nucléotides de l'ADN (Duca et al., 2008). La spécificité de l'interaction entre un doigt de zinc et un triplet d'ADN est connue et il est donc possible de définir la structure peptidique requise pour promouvoir l'interaction entre une séquence pré-établie de 6, 9 ou 12 nucléotides et une protéine composée d'une suite de 2, 3 ou 4 motifs Zinc Finger. Pour note, un autre motif d'interaction avec l'ADN de type *Drosophila* Ubxhomeodomain a été testé selon le même principe (Kim et al., 1996).

L'expression concomitante de deux ZFN capables de se fixer à l'ADN en reconnaissant des séquences physiquement proches permet la dimérisation des domaines endonucléases et donc la coupure de l'ADN entre les sites de fixation. Cette coupure double brin (DSB, double strand break) active le système de réparation de la cellule. Cette réparation se fait par des mécanismes comme le collage des extrémités d'ADN (NHEJ), et est souvent associée à l'introduction de petites mutations (changement de bases, élimination ou addition d'un petit nombre de bases) qui peut mener à l'inactivation de gènes. En présence d'une séquence matrice, montrant une forte similarité de séquence avec la séquence coupée, une recombinaison homologue (RH) peut entraîner la substitution de la séquence coupée par la séquence matrice. Ceci permet d'introduire des changements précis dans la séquence (modification dirigée de la séquence d'un gène) où même d'insérer des fragments d'ADN hétérologues (transgénèse ciblée).

³² Méganucléase : enzyme qui coupe l'ADN après avoir reconnu une séquence longue, par rapport aux enzymes de restriction qui reconnaissent des séquences le plus souvent comprises entre 4 et 8 nucléotides.

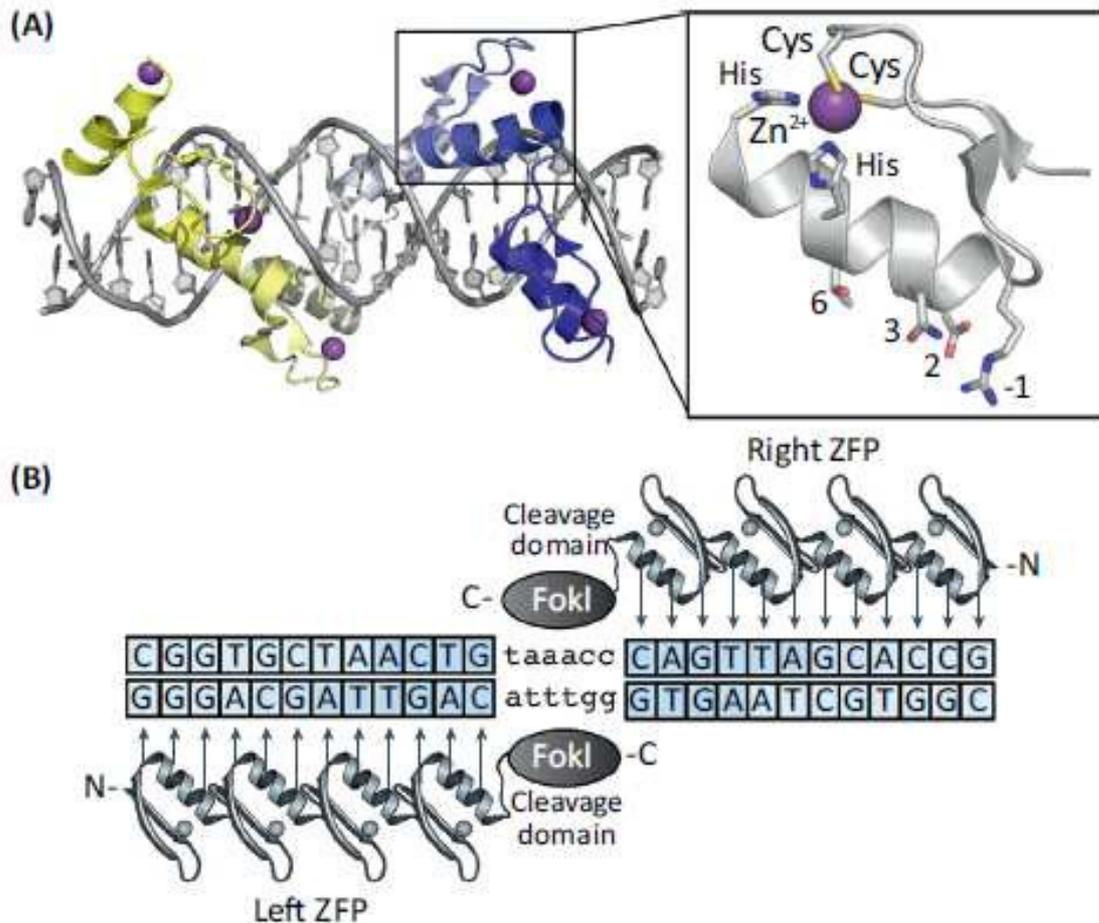


Figure 1 : structure d'un doigt de zinc (Gaj et al., 2013).
 (A) Protéine à doigt de zinc complexée avec l'ADN cible (gris) (PDB ID: 2I13).
 (B) Schéma d'un dimère de zinc finger nuclease (ZFN) lié à l'ADN.

Modalités de mise en œuvre

La présence des deux protéines ZFN dans le noyau de la cellule que l'on souhaite modifier est nécessaire. La technologie repose actuellement sur le transfert de deux unités d'expression codant chacune une ZFN, sur le transfert des deux ARNm codant cette même paire de ZFN, voire sur le transfert des ZFN sous forme de protéines.

La taille des séquences codantes des ZFN (environ 1150 pb) a permis de tester de nombreux systèmes de vectorisation avec pour simple requis d'éviter le maintien de l'expression de la paire de ZFN dans la cellule afin de prévenir une toxicité liée à une continuelle activité endonucléase. Dans le cas où les ZFN seraient introduits de façon stable par transformation génétique, une fois la mutation générée, ces transgènes ne seraient plus utiles et, dans la plupart de cas, pourraient être éliminés par ségrégation. Cette élimination pourrait être validée par une analyse moléculaire simple et sensible de type séquençage.

Utilisations possibles

Ce système peut être utilisé pour générer des mutations ponctuelles ciblées, des délétions ou des insertions par recombinaison homologue. Il est utilisable chez les plantes, les animaux, les micro-organismes ainsi qu'en thérapie génique.

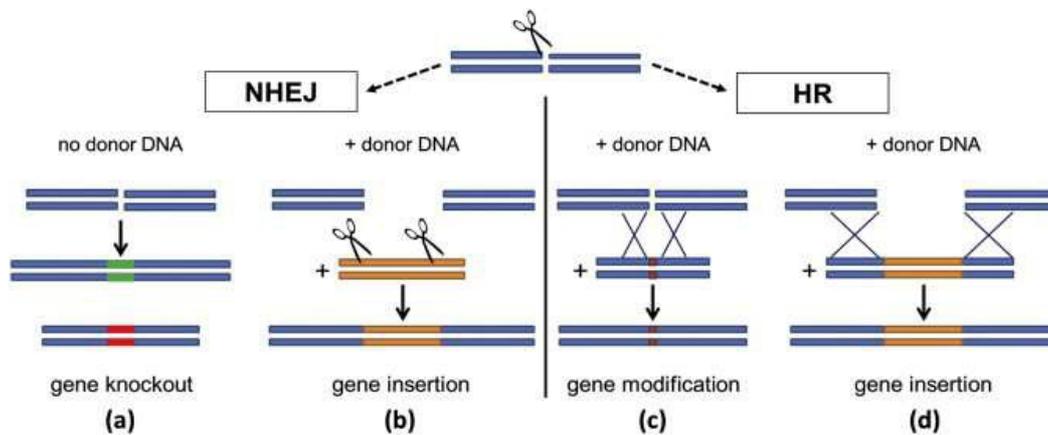


Figure 2 : Edition ciblée du génome avec les nucléases (Bortesi and Fischer, 2015).

Les coupures doubles brins induites par les nucléases peuvent être réparées soit par non-homologous end joining (NHEJ) soit par recombinaison homologue (HR). (a) La réparation par NHEJ résulte généralement en une insertion (vert) ou une délétion (rouge) de paires de bases aléatoires provoquant un KO du gène par décalage du cadre de lecture. (b) Si un ADN donneur est disponible (orange) et simultanément coupé par la même nucléase il peut laisser des extrémités cohésives et permettre une insertion par NHEJ. (c) La recombinaison homologue avec un ADN donneur peut être utilisée afin de modifier un gène en introduisant une substitution nucléotidique précise ou (d) une insertion de gène.

Avantages et contraintes par rapport aux techniques existantes

Le choix des motifs « en doigt de zinc » à utiliser pour construire une ZFN ayant des qualités d'hybridation spécifiques est complexe et repose sur une expertise qui nécessite souvent un recours à une société prestataire de service pour la fabrication des ZFN. Toutefois, des bases de données compilant les informations relatives aux ZFN fonctionnelles peuvent être trouvées sur Internet, de même que des sites proposant les algorithmes pertinents (exemple : <http://zifit.partners.org/ZiFiT/> - <http://eendb.zfgenetics.org/>). Par ailleurs, l'usage montre qu'il n'est pas possible avec cette technique de cibler toutes les séquences nucléiques.

État de l'art (non exhaustif)

Phased'avancement :

Chezesvégétaux :

Sangamo Biosciences, Inc (USA) est détenteur du brevet (depuis 2006) et désigne les ZFN par le terme ZFP Nuclease (Zinc Finger Protein Nuclease)

Le stade 1, correspondant à l'optimisation du ciblage du gène et du transfert, est en cours pour un grand nombre d'espèces.

Le stade 2, correspondant à la génération d'organismes évaluables sur le plan phénotypique a été abordé avec succès. En agronomie, une preuve de concept permettant l'utilisation des ZFN pour l'empilage de différents traits d'intérêt dans un site « contrôlé » a été obtenue (Ainley et al., 2013).

Chez d'autres organismes :

Le stade 1, correspondant à l'optimisation du ciblage du gène et du transfert, est en cours pour un grand nombre d'espèces.

Le stade 2, correspondant à la génération d'organismes évaluables sur le plan phénotypique a été abordé avec succès. Des utilisations sont en cours dans le cadre de certaines pathologies humaines (hémoglobinopathies, hémophilies, chorée de Huntington, ou les syndromes de Hurler et de Hunter...).

Le stade 3, correspond au stade de l'essai clinique, en particulier :

En utilisation thérapeutique :

Cette technologie a d'ores et déjà été développée depuis 2009 dans un essai de thérapie génique en Phase II sur le ciblage du récepteur cellulaire CCR5 pour prévenir le VIH (USA, Protocole SB728, [SangamoBioSciences, Inc. : http://www.sangamo.com/pipeline/sb-728.html](http://www.sangamo.com/pipeline/sb-728.html)).

Le stade 4, correspond au stade de la soumission AMM, pré-marketing :

Si les résultats des essais de thérapie génique sur le ciblage du récepteur CCR5 sont suffisamment robustes, une AMM pourra être demandée.

L'historique d'utilisation fait que cette technique reste pertinente auprès des entreprises. Cependant, l'essor des TALEN et des CRISPR/Cas9, moins onéreux et plus simples à mettre en œuvre, devrait peu à peu concurrencer cette technique.

Pour les utilisations en biologie humaine, la question éthique des cellules souches embryonnaires totipotentes se pose, la thérapie génique germinale est actuellement interdite.

Recherche fondamentale :

Réalisation (organismes testés)

Organisme	Références	Vectorisation
Homme	(Brunet et al., 2009)	Transfection
	(DeKolver et al., 2010)	Transfection
	(Lombardo et al., 2007)	IDLV
	(Phang et al., 2013)	Baculovirus
	(Maier et al., 2013)	Adénovirus
	(Coluccio et al., 2013)	Adénovirus, IDLV
Rat	(Geurts et al., 2009)	Microinjection d'embryon
Souris	(Chen et al., 2014)	Microinjection d'embryon
	(Anguela et al., 2013)	AAV
Zebrafish	(Doyon et al., 2008)	
Drosophile	(Beumer et al., 2008)	
B.mori	(Takasu et al., 2010)	Injection d'ARNm
Mouton	(Chen et al., 2014)	Transfection
Soja	(Curtin et al., 2013)	
Mais	(Ainley et al., 2013)	Bombardement
Tabac	(Marton et al., 2010)	Virus du «rattle» du tabac
Petunia	(Marton et al., 2010)	Virus du «rattle» du tabac
Arabidopsis	(de Pater et al., 2013)	«floral dip», ou trempage floral dans une suspension d'Agrobacterium tumefaciens

Tableau 1 : Liste d'organismes dont le génome a pu être modifié à l'aide de ZFN.

Revue de littérature référence

(Le Provost et al., 2010)
(Gaj et al., 2013)

Remarques

La détection de la mutation induite sera toujours détectable quelle que soit la technique utilisée : mutation ponctuelle dirigée, conversion génique, KO par NHEJ ou la recombinaison homologe. En revanche, l'analyse de la mutation ne donnera pas d'indications quant à la méthode utilisée pour l'obtenir. De plus il sera impossible par cette analyse de définir s'il s'agit d'un variant naturel, d'un variant obtenu par manipulation génétique ou du résultat d'un croisement.

Dans le cas de l'insertion ciblée de gènes (transgénèse, cisgénèse, intragénèse), la séquence introduite ainsi que ses bordures seraient aisément caractérisables.

Dès lors que les lignées germinales ou des cellules souches embryonnaires sont modifiées, la modification peut être transmise verticalement.

Spécificité de la modification (Effets dits « Off target »)

Les coupures non spécifiques sont observées mais peuvent s'avérer difficilement quantifiables. Chez l'animal, le séquençage complet des génomes rend possible la détection et la caractérisation des mutations hors cible. Ces événements ne sont pas fréquents. Pour l'interprétation de ces résultats, la connaissance de la variation naturelle, c'est-à-dire la fréquence des mutations spontanées qui surviennent à chaque génération, sera à considérer. Le phénotype reste également un excellent indicateur.

Comme pour les autres méthodes mettant en œuvre des nucléases, l'évaluation et la détection des coupures non spécifiques restent une question. Il s'agit là d'un axe de recherche et développement très actif.

Chez les plantes, il est possible, par croisements successifs, d'éliminer les mutations non souhaitées comme cela se fait en sélection traditionnelle.

Pour la thérapie génique somatique, il ne sera néanmoins pas possible de trier les cellules corrigées. D'importantes recherches visent à diminuer les mutations hors cible.

Pour la modification de cellules souches thérapeutiques et pour les animaux de rente, une sélection des cellules serait possible.

Bibliographie

Ainley, W.M., Sastry-Dent, L., Welter, M.E., Murray, M.G., Zeitler, B., Amora, R., Corbin, D.R., Miles, R.R., Arnold, N.L., Strange, T.L., et al., (2013). Trait stacking via targeted genome editing. *Plant Biotechnol. J.* 11, 1126–1134.

Anguela, X.M., Sharma, R., Doyon, Y., Miller, J.C., Li, H., Haurigot, V., Rohde, M.E., Wong, S.Y., Davidson, R.J., Zhou, S., et al., (2013). Robust ZFN-mediated genome editing in adult hemophilic mice. *Blood* 122, 3283–3287.

Beumer, K.J., Trautman, J.K., Bozas, A., Liu, J.-L., Rutter, J., Gall, J.G., and Carroll, D. (2008). Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 19821–19826.

Bortesi, L., and Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol. Adv.* 33, 41–52.

Brunet, E., Simsek, D., Tomishima, M., DeKolver, R., Choi, V.M., Gregory, P., Urnov, F., Weinstock, D.M., and Jasin, M. (2009). Chromosomal translocations induced at specified loci in human stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10620–10625.

Chen, Y.-G., Forsberg, M.H., Khaja, S., Ciecko, A.E., Hessner, M.J., and Geurts, A.M. (2014). Gene targeting in NOD mouse embryos using zinc-finger nucleases. *Diabetes* 63, 68–74.

Coluccio, A., Miselli, F., Lombardo, A., Marconi, A., Malagoli Tagliazucchi, G., Gonçalves, M.A., Pincelli, C., Maruggi, G., Del Rio, M., Naldini, L., et al., (2013). Targeted gene addition in human epithelial stem cells by zinc-finger nuclease-mediated homologous recombination. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 21, 1695–1704.

Curtin, S.J., Anderson, J.E., Starker, C.G., Baltes, N.J., Mani, D., Voytas, D.F., and Stupar, R.M. (2013). Targeted mutagenesis for functional analysis of gene duplication in legumes. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1069, 25–42.

DeKolver, R.C., Choi, V.M., Moehle, E.A., Paschon, D.E., Hockemeyer, D., Meijnsing, S.H., Sancak, Y., Cui, X., Steine, E.J., Miller, J.C., et al., (2010). Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. *Genome Res.* 20, 1133–1142.

Doyon, Y., McCammon, J.M., Miller, J.C., Faraji, F., Ngo, C., Katibah, G.E., Amora, R., Hocking, T.D., Zhang, L., Rebar, E.J., et al., (2008). Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 26, 702–708.

Duca, M., Vekhoff, P., Oussedik, K., Halby, L., and Arimondo, P.B. (2008). The triple helix: 50 years later, the outcome. *Nucleic Acids Res.* 36, 5123–5138.

Gaj, T., Gersbach, C.A., and Barbas, C.F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 31, 397–405.

Geurts, A.M., Cost, G.J., Freyvert, Y., Zeitler, B., Miller, J.C., Choi, V.M., Jenkins, S.S., Wood, A., Cui, X., Meng, X., et al., (2009). Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 325, 433.

Kim, Y.G., Cha, J., and Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1156–1160.

Lombardo, A., Genovese, P., Beausejour, C.M., Colleoni, S., Lee, Y.-L., Kim, K.A., Ando, D., Urnov, F.D., Galli, C., Gregory, P.D., et al., (2007). Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat. Biotechnol.* 25, 1298–1306.

Maier, D.A., Brennan, A.L., Jiang, S., Binder-Scholl, G.K., Lee, G., Plesa, G., Zheng, Z., Cotte, J., Carpenito, C., Wood, T., et al., (2013). Efficient clinical scale gene modification via zinc finger nuclease-targeted disruption of the HIV co-receptor CCR5. *Hum. Gene Ther.* 24, 245–258.

Marton, I., Zuker, A., Shklarman, E., Zeevi, V., Tovkach, A., Roffe, S., Ovadis, M., Tzfira, T., and Vainstein, A. (2010). Nontransgenic genome modification in plant cells. *Plant Physiol.* 154, 1079–1087.

Moehle, E.A., Moehle, E.A., Rock, J.M., Rock, J.M., Lee, Y.-L., Lee, Y.L., Jouvenot, Y., Jouvenot, Y., DeKolver, R.C., Dekolver, R.C., et al., (2007). Targeted gene addition into a specified

location in the human genome using designed zinc finger nucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3055–3060.

De Pater, S., Pinas, J.E., Hooykaas, P.J.J., and van der Zaal, B.J. (2013). ZFN-mediated gene targeting of the *Arabidopsis* protoporphyrinogen oxidase gene through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation. *Plant Biotechnol. J.* 11, 510–515.

Phang, R.-Z., Tay, F.C., Goh, S.-L., Lau, C.-H., Zhu, H., Tan, W.-K., Liang, Q., Chen, C., Du, S., Li, Z., et al. (2013). Zinc finger nuclease-expressing baculoviral vectors mediate targeted genome integration of reprogramming factor genes to facilitate the generation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl. Med.* 2, 935–945.

Le Provost, F., Lillico, S., Passet, B., Young, R., Whitelaw, B., and Vilotte, J.-L. (2010). Zinc finger nuclease technology heralds a new era in mammalian transgenesis. *Trends Biotechnol.* 28, 134–141.

Takasu, Y., Kobayashi, I., Beumer, K., Uchino, K., Sezutsu, H., Sajwan, S., Carroll, D., Tamura, T., and Zurovec, M. (2010). Targeted mutagenesis in the silkworm *Bombyx mori* using zinc finger nuclease mRNA injection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 759–765.

FICHE NOUVELLES TECHNIQUES

TALE-NUCLEASE (TALEN)

Présentation générale de la technique (Grand public)

Le système TALEN est un outil de coupure ciblée de l'ADN d'un organisme. Ces « ciseaux moléculaires » reconnaissent et coupent une séquence précise et généralement unique de l'ADN. L'objectif de ce type de coupure ciblée est d'obtenir :

- L'inactivation d'un gène : pour en étudier la fonction, par exemple.
- La mutation ponctuelle d'un gène, pour introduire une forme différente de ce gène : échanger la séquence d'un gène présent dans une variété avec celui d'une autre en conservant les propriétés de cette variété.
- La substitution d'une séquence génétique par une autre : objectif identique au précédent mais avec plusieurs changements dans le même gène.
- L'insertion à un endroit précis du génome d'un gène d'intérêt : pour, par exemple, réaliser une transgénèse en choisissant le site génétique où le transgène est intégré.

L'intérêt du système vient de ce qu'il est possible, par le biais d'une ingénierie protéique, de « programmer » la protéine pour qu'elle reconnaisse une séquence choisie. Cette technique est robuste mais nécessite une mise au point complexe comparée à d'autres techniques.

Principe et fonctionnement au niveau cellulaire et moléculaire

Partageant le même objectif que les technologies ZFN et CRISPR, la technologie des TALEN (Transcriptor Activator Like Effector Nuclease) repose sur le principe de l'interaction spécifique d'une protéine avec une séquence d'ADN présélectionnée. Le clivage de l'ADN cible par une endonucléase active une cascade de réparation de type Non Homologous End Joining (NHEJ) induisant des modifications de l'ADN, ou de type Homologous Recombination (HR), si une séquence d'ADN modèle est transférée concomitamment. Il en résulte une modification de l'ADN ciblé, par délétion ou substitution nucléotidique, voire par addition d'une séquence d'ADN (Hockemeyer et al., 2011).

Les TALEN sont des protéines chimériques composées du domaine de clivage d'une endonucléase (par exemple : Fok1) fusionné à des répétitions de séquences de 33 à 35 acides aminés qui dérivent des motifs TALE. Les TALE sont des protéines bactériennes capables d'interagir spécifiquement avec les séquences d'ADN d'une plante et de modifier la transcription de gènes de celle-ci (Mussolino and Cathomen, 2012)(Gaj et al., 2013).

L'endonucléase Fok1 ne clivant l'ADN que sous forme de dimère, son activité repose sur l'expression concomitante de deux TALEN, chacune se fixant de part et d'autre d'une séquence nucléotidique de 12 à 20 paires de bases. La coupure des deux brins d'ADN (DSB, double strand break) active le système de réparation de l'ADN de la cellule. Les mécanismes de réparation par « collage » des extrémités d'ADN (NHEJ) permettent l'inactivation de gènes. En présence d'une séquence matrice, montrant une forte similarité de séquence avec la séquence coupée, une recombinaison homologue (HR) peut entraîner la substitution de la séquence coupée par la séquence matrice. Ceci permet d'introduire des changements précis dans la séquence (modification dirigée de la séquence d'un gène) où même d'insérer des fragments d'ADN hétérologues (transgenèse ciblée).

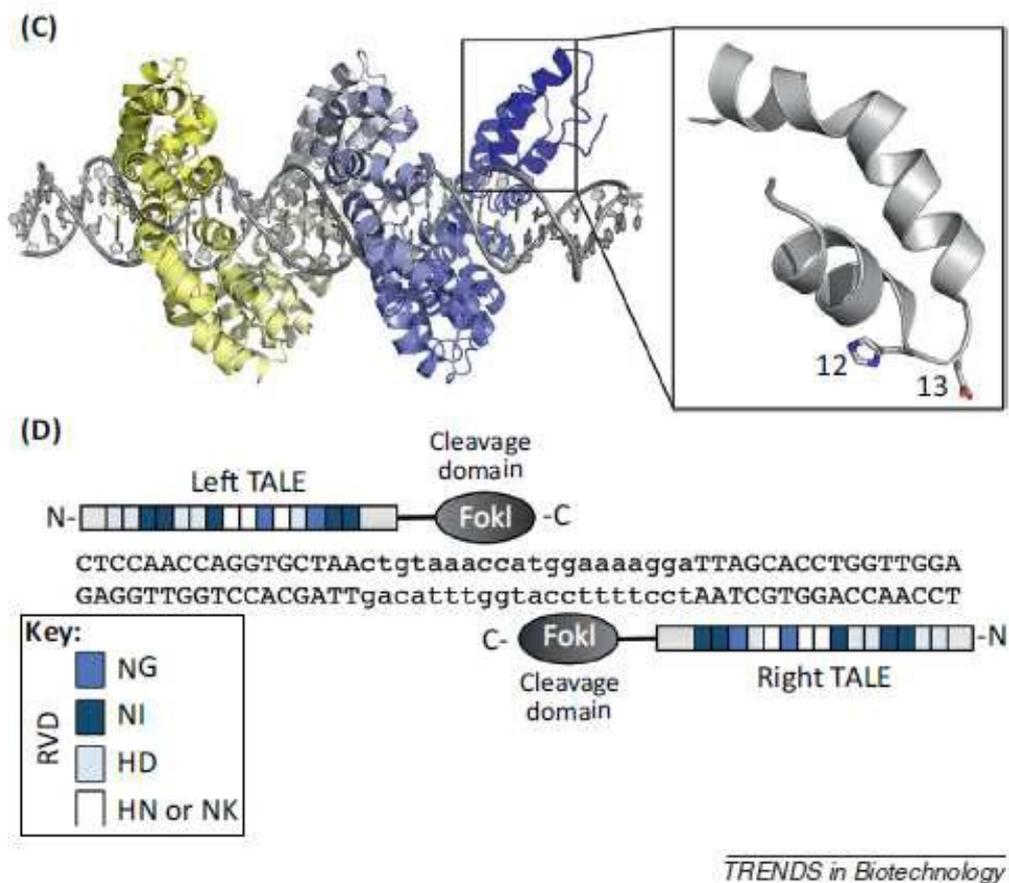


Figure 1 : Structure d'un « transcription activator-like effector » (TALE) (Gaj et al., 2013).
 (C) Protéine TALE complexée avec l'AND cible (gris) (PDB ID: 3UGM)
 (D) Schéma d'un dimère de TALE nuclease (TALEN) lié à l'ADN.

Modalités de mise en œuvre

La présence des deux protéines TALEN dans le noyau de la cellule que l'on souhaite modifier est nécessaire. La technologie repose actuellement sur le transfert de deux unités d'expression codant chacune une TALEN, sur le transfert des deux ARNm codant cette même paire de TALEN ou sur l'injection des deux TALEN sous forme protéique.

La taille des séquences codantes des TALEN (environ 3kb) a permis de tester de nombreux systèmes de vectorisation (voir tableau 1) avec pour simple requis d'éviter le maintien de l'expression de la paire de TALEN dans la cellule afin de prévenir une toxicité liée à une activité endonucléase. Dans le cas où les TALEN seraient introduits de façon stable par transformation génétique, une fois la mutation générée, ces transgènes ne seraient plus utiles et, dans la plupart de cas, pourraient être éliminés par ségrégation. Cette élimination pourrait être validée par une analyse moléculaire simple et sensible de type séquençage.

Utilisations possibles

Ce système peut être utilisé pour générer des mutations ponctuelles ciblées, des délétions ou des insertions par recombinaison homologue. Il est utilisable chez les plantes, les animaux et les bactéries.

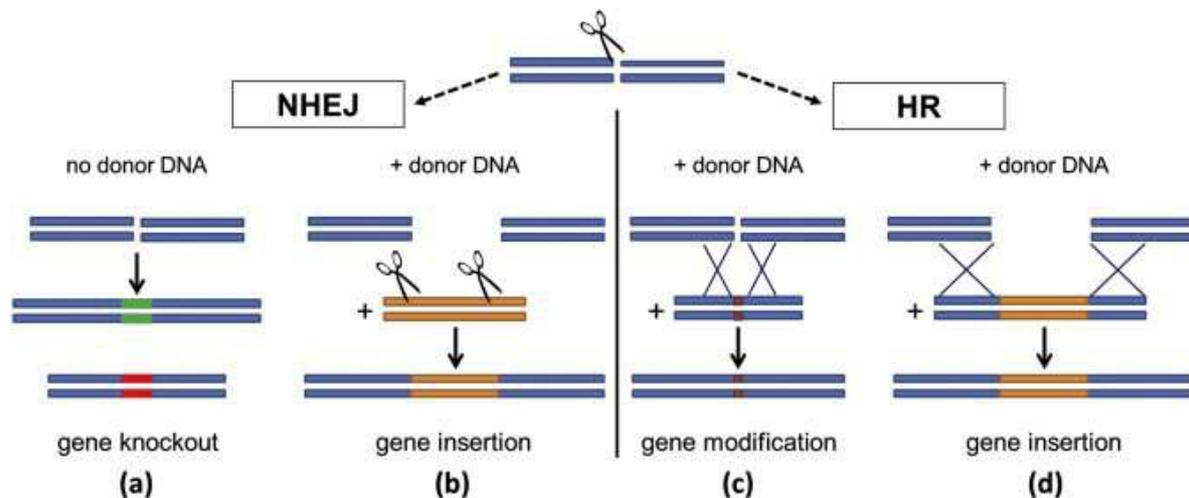


Figure 2 : Edition ciblée du génome avec les nucléases (Bortesi and Fischer, 2015).

Les coupures doubles brins induites par les nucléases peuvent être réparées soit par non-homologous end joining (NHEJ) soit par recombinaison homologue (HR). (a) La réparation par NHEJ résulte généralement en une insertion (vert) ou une délétion (rouge) de paires de bases aléatoires provoquant un KO du gène par décalage du cadre de lecture. (b) Si un ADN donneur est disponible (orange) et simultanément coupé par la même nucléase il peut laisser des extrémités cohésives et permettre une insertion par NHEJ. (c) La recombinaison homologue avec un ADN donneur peut être utilisée afin de modifier un gène en introduisant une substitution nucléotidique précise ou (d) une insertion plus longue d'ADN.

Il est intéressant de noter que d'autres applications reposant sur ce système d'interaction ciblée avec l'ADN sont en cours de développement. Elles visent à guider des protéines impliquées dans la régulation de la transcription, par modification de la méthylation de l'ADN ou de l'acétylation des histones, par exemple. Ces techniques ne nécessitent pas le clivage de l'ADN et mettent en œuvre une TALEN doublement modifiée, par la perte de la fonction endonucléase et l'ajout d'un domaine fonctionnel.

État de l'art (non exhaustif)

Phased'avancement :

Chezesvégétaux

Le stade 1, correspondant à l'optimisation du ciblage du gène et à la transformation de l'espèce, est en cours pour un grand nombre d'espèces.

Le stade 2, correspondant à la génération d'organismes évaluables sur le plan phénotypique, est accessible sur le plan végétal. Des développements sont en cours pour produire des huiles à teneurs en acides gras saturés plus faibles (soja et colza), du blé à faible teneur en gluten ou des pommes de terres produisant moins d'acrylamide une fois cuites (<http://www.calyxt.com/products/>).

Le stade 3, correspondant au stade de l'essai au champ : pas d'essais connus à ce jour.

Le stade 4, correspondant au stade de la soumission AMM, pré-marketing : pas de demande connue à ce jour.

Chezlesautresorganismes :

Le stade 1, correspondant à l'optimisation du ciblage du gène et à la transformation de l'espèce est en cours pour un grand nombre d'espèces.

Le stade 2, correspondant à la génération d'organismes évaluables sur le plan phénotypique : Il existe des pistes pour leur utilisation en thérapie génique (Finotti et al., 2015) et en immunothérapie (lymphocytes CAR T, Cellectis).

Le stade 3, correspondant au stade de l'essai clinique :

Essai de thérapie de cancers par l'utilisation de lymphocytes T ingénierées est en cours (<http://www.cellectis.com/fr/produits-therapeutiques>).

Le stade 4, correspondant au stade de la soumission AMM, pré-marketing : si les résultats des essais de thérapie de cancers sont positifs, une AMM pourra être demandée.

Recherchefondamentale :

Organisme	Références	Modalités de mise en oeuvre
Homme	(Holkers et al., 2013)	Adenovirus
	(Holkers et al., 2013)	Lentivirus/IDLV
	(Zhang et al., 2013b)	Adenovirus
	(Zhang et al., 2013b)	PiggyBac
	(Zhu et al., 2013)	Baculovirus
Rat	(Ferguson et al., 2013)	Microinjection
Zebrafish	(Xiao et al., 2013)	Injection
Saccharomyces	(Aouida et al., 2014)	
Drosophile	(Katsuyama et al., 2013)	Microinjection
Caenorhabditiselegans	(Wei et al., 2013)	
B. mori	(Wang et al., 2013)	
Souris	(Wefers et al., 2013)	Microinjection d'ARNm
Riz	(Li et al., 2012)	Transfection
Arabidopsis	(Cermak et al., 2011)	Transfection
Tabac	(Zhang et al., 2013a)	Transfection

Tableau 1 : Liste d'organismes dont le génome a pu être modifié à l'aide de TALEN et leur vectorisation.

Revue de référence

Plantes :

(Chen and Gao, 2013) et (Osakabe and Osakabe, 2015)

Générales :

(Ain et al., 2015) et (Gaj et al., 2013)

Remarques

Détection de la modification introduite

La détection de la mutation induite sera toujours détectable quelle que soit la technique utilisée : mutation ponctuelle dirigée, conversion génique, KO par NHEJ ou la recombinaison homologe. En revanche, l'analyse de la mutation ne donnera pas d'indications quant à la méthode utilisée pour l'obtenir. De plus il sera impossible par cette analyse de définir s'il s'agit d'un variant naturel, d'un variant obtenu par manipulation génétique ou du résultat d'un croisement.

Dans le cas de l'insertion ciblée de gènes (transgénèse, cisgénèse, intragénèse), la séquence introduite ainsi que ses bordures seraient aisément caractérisables.

Transmission génétique

Dès lors que les lignées germinales ou des cellules souches sont modifiées la modification pourra être transmissible verticalement. Au sein d'un organisme, cela dépendra du mode de renouvellement cellulaire.

Spécificité de la modification (Effets dits «Off target»)

Les coupures non spécifiques sont observées mais peuvent s'avérer difficilement quantifiables. Chez l'animal, le séquençage complet des génomes rend possible la détection et la caractérisation des mutations hors cible. Ces événements ne sont pas fréquents. Pour l'interprétation de ces résultats, la connaissance de la variation naturelle, c'est-à-dire la fréquence des mutations spontanées qui surviennent à chaque génération, sera à considérer. Le phénotype reste également un excellent indicateur.

Comme pour les autres méthodes mettant en œuvre des nucléases, l'évaluation et la détection des coupures non spécifiques restent une question. Il s'agit là d'un axe de recherche et développement très actif.

Chez les plantes, il est possible, par croisements successifs, d'éliminer les mutations non souhaitées comme cela se fait en sélection traditionnelle.

Pour la thérapie génique somatique, il ne sera néanmoins pas possible de trier les cellules corrigées. D'importantes recherches visent à diminuer les mutations hors cible.

Pour la modification de cellules souches thérapeutiques et pour les animaux de rente, une sélection des cellules serait possible.

Bibliographie

Ain, Q.U., Chung, J.Y., and Kim, Y.-H. (2015). Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 205, 120–127.

Aouida, M., Piatek, M.J., Bangarusamy, D.K., and Mahfouz, M.M. (2014). Activities and specificities of homodimeric TALENs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 60, 61–74.

Bortesi, L., and Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol. Adv.* 33, 41–52.

Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F. (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* 39, e82.

Chen, K., and Gao, C. (2013). TALENs: customizable molecular DNA scissors for genome engineering of plants. *J. Genet. Genomics Yi Chuan Xue Bao* 40, 271–279.

Ferguson, C., McKay, M., Harris, R.A., and Homanics, G.E. (2013). Toll-like receptor 4 (Tlr4) knockout rats produced by transcriptional activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated gene inactivation. *Alcohol Fayettev. N* 47, 595–599.

Finotti, A., Breda, L., Lederer, C.W., Bianchi, N., Zuccato, C., Kleanthous, M., Rivella, S., and Gambari, R. (2015). Recent trends in the gene therapy of β -thalassemia. *J. Blood Med.* 6, 69–85.

Gaj, T., Gersbach, C.A., and Barbas, C.F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 31, 397–405.

Grau, J., Boch, J., and Posch, S. (2013). TALENoffer: genome-wide TALEN off-target prediction. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 29, 2931–2932.

Hockemeyer, D., Wang, H., Kiani, S., Lai, C.S., Gao, Q., Cassady, J.P., Cost, G.J., Zhang, L., Santiago, Y., Miller, J.C., et al., (2011). Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat. Biotechnol.* 29, 731–734.

Holkers, M., Maggio, I., Liu, J., Janssen, J.M., Miselli, F., Mussolino, C., Recchia, A., Cathomen, T., and Gonçalves, M.A.F.V. (2013). Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic Acids Res.* 41, e63.

Katsuyama, T., Akmammedov, A., Seimiya, M., Hess, S.C., Sievers, C., and Paro, R. (2013). An efficient strategy for TALEN-mediated genome engineering in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 41, e163.

Li, T., Liu, B., Spalding, M.H., Weeks, D.P., and Yang, B. (2012). High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat. Biotechnol.* 30, 390–392.

Mussolino, C., and Cathomen, T. (2012). TALE nucleases: tailored genome engineering made easy. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 644–650.

Osakabe, Y., and Osakabe, K. (2015). Genome editing with engineered nucleases in plants. *Plant Cell Physiol.* 56, 389–400.

Wang, F., Ma, S., Xu, H., Duan, J., Wang, Y., Ding, H., Liu, Y., Wang, X., Zhao, P., and Xia, Q. (2013). High-efficiency system for construction and evaluation of customized TALENs for silkworm genome editing. *Mol. Genet. Genomics* 288, 683–690.

Wefers, B., Panda, S.K., Ortiz, O., Brandl, C., Hensler, S., Hansen, J., Wurst, W., and Kühn, R. (2013). Generation of targeted mouse mutants by embryo microinjection of TALEN mRNA. *Nat. Protoc.* 8, 2355–2379.

Wei, C., Liu, J., Yu, Z., Zhang, B., Gao, G., and Jiao, R. (2013). TALEN or Cas9 - rapid, efficient and specific choices for genome modifications. *J. Genet. Genomics Yi Chuan Xue Bao* 40, 281–289.

Xiao, A., Wang, Z., Hu, Y., Wu, Y., Luo, Z., Yang, Z., Zu, Y., Li, W., Huang, P., Tong, X., et al., (2013). Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Res.* 41, e141.

Zhang, Y., Zhang, F., Li, X., Baller, J.A., Qi, Y., Starker, C.G., Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F. (2013a). Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant Physiol.* 161, 20–27.

Zhang, Z., Zhang, S., Huang, X., Orwig, K.E., and Sheng, Y. (2013b). Rapid assembly of customized TALENs into multiple delivery systems. *PLoS One* 8, e80281.

Zhu, H., Lau, C.-H., Goh, S.-L., Liang, Q., Chen, C., Du, S., Phang, R.-Z., Tay, F.C., Tan, W.-K., Li, Z., et al., (2013). Baculoviral transduction facilitates TALEN-mediated targeted transgene integration and Cre/LoxP cassette exchange in human-induced pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res.* 41, e180.

FICHE NOUVELLES TECHNIQUES

CRISPR-CAS9 ET NUCLÉASES GUIDÉES PAR ARN

Présentation générale de la technique (Grand public)

Le système dérivé des gènes bactériens CRISPR/Cas est un outil de coupure ciblée de l'ADN d'un organisme. Ces « ciseaux moléculaires » reconnaissent et coupent une séquence précise et généralement unique de l'ADN. L'objectif de ce type de coupure ciblée est d'obtenir :

- L'inactivation d'un gène : pour en étudier la fonction par exemple.
- La mutation ponctuelle d'un gène, pour introduire une forme différente de ce gène : échanger la forme d'un gène présent dans une variété avec celui d'une autre en conservant les propriétés de cette variété.
- La substitution d'une séquence génétique par une autre : objectif identique au précédent mais avec plusieurs changements dans le même gène.
- L'insertion à un endroit précis du génome d'un gène d'intérêt : pour, par exemple, réaliser une transgénèse en choisissant le site génétique où le transgène est intégré.

L'intérêt du système vient de ce qu'il est possible de le « programmer » pour reconnaître la séquence choisie de façon simple, rapide et relativement peu onéreuse. Ce système possède une très bonne efficacité et spécificité. La vérification de l'action recherchée peut être obtenue par des méthodes de génétique moléculaire simple.

Principe et fonctionnement cellulaire et moléculaire

Le système CRISPR/Cas (CRISPR : clustered regularly interspaced short palindromic repeats) est un mécanisme d'immunité adaptative décrit chez des procaryotes (il existe plus de trois systèmes différents et c'est le CRISPR/CRISPR-associated Cas system Type II qui est utilisé). Ce mécanisme repose sur l'expression du locus CRISPR du génome bactérien. Ce locus est constitué de l'insertion de séquences d'ADN provenant du génome d'agents « infectieux » des bactéries et de motifs d'ADN spécialisés. La transcription du locus CRISPR permet la synthèse des CRISPR-RNA ou crRNA, composés d'une séquence de ciblage du génome de l'agent infectieux et de motifs spécifiques. Le crRNA est associé à une seconde molécule, le TracrRNA qui s'hybride au crRNA. Ces deux molécules associées sont reconnues par l'endonucléase bactérienne Cas9 pour former un complexe qui interagit et clive l'ADN double brin du génome de l'agent lors d'une infection. C'est la complémentarité de la séquence du crRNA avec la séquence de l'agent qui donne la spécificité de coupure de la Cas9 qui contribue ainsi à éliminer l'agent infectieux. Cette interaction requiert des motifs particuliers de la séquence cible, dont la séquence PAM (Protospacer adjacent Motif) et les éléments d'espacements du crRNA (spacer) pour assurer un fonctionnement optimal du complexe (Mali et al., 2013a; Richter et al., 2013). Le fonctionnement du locus CRISPR est assimilé à un système de protection ciblé contre certains agents infectieux.

Les technologies d'ingénierie moléculaire utilisant ce système reposent sur la possibilité de contrôler le ciblage et le fonctionnement de ces composants et de les réunir dans la cellule dont on souhaite modifier le génome. Le crRNA est ainsi modifié pour cibler le complexe vers une séquence génétique choisie par l'utilisateur et exprimé sous la forme ARN dit guide (sgRNA, small guide RNA) rassemblant les motifs du TracrRNA et du crRNA en une seule molécule. Techniquement, il est nécessaire que tous les éléments décrits ci-dessus soient présents concomitamment dans la cellule et l'introduction de cet ARN guide est effectué en parallèle avec le transfert d'une unité d'expression de la protéine Cas9. Il existe des outils informatiques permettant le dessin d'ARN guides à disposition de la communauté scientifique (<http://crispr.mit.edu/> - <http://zifit.partners.org/ZiFiT/> - <http://eendb.zfgenetics.org/>).

Dans cette stratégie, l'endonucléase Cas9 recrutée vers cette séquence coupe le double brin d'ADN (DSB, Double Strand Break) et active le système de réparation d'ADN de la cellule. Les mécanismes de réparation par « collage » des extrémités d'ADN (NHEJ) permettent l'inactivation de gènes.

En présence d'une séquence matrice, montrant une forte similarité de séquence avec la séquence coupée, une recombinaison homologue (HR) peut entraîner la substitution de la séquence coupée par la séquence matrice. Ceci permet d'introduire des changements précis dans la séquence (modification dirigée de la séquence d'un gène) où même d'insérer des fragments d'ADN hétérologues (transgénèse ciblée).

En pratique, ce système permet :

- L'inactivation de gènes (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013b), ce qui permet les études fonctionnelles des gènes ; l'inactivation d'un gène dont la protéine a une fonction non

souhaitée (un récepteur à un virus par exemple) ou l'inactivation d'une voie métabolique pour en favoriser une autre par exemple.

- La conversion génique, pour provoquer des échanges d'allèles : introduire un allèle de résistance à une maladie, changer un allèle associé à une maladie contre l'allèle physiologique (Auer and Del Bene, 2014; Hisano et al., 2015; Kimura et al., 2014).
- L'insertion ciblée dans une région génomique précise de fragment d'ADN : transgénèse, cisgénèse ou intragénèse ciblées.

Modalités de mise en œuvre

La question de la vectorisation est purement technique et fait l'objet de travaux qui visent à favoriser les systèmes transitoires.

La taille de la séquence codant la protéine Cas9 (plus de 1000 acides aminés pour la protéine Cas9 de *S. pyogenes* qui est la plus utilisée) limite l'utilisation des vecteurs de transfert viraux. Les techniques de transfection classiques avec des vecteurs plasmidiques sont favorisées dans l'attente de l'obtention de protéines Cas9 de plus petite taille. L'utilisation de système d'expression ADN de la protéine Cas9 ayant l'inconvénient de promouvoir une expression prolongée de cette protéine pour laquelle une action transitoire est suffisante, des techniques de transfection d'ARNm codant la protéine Cas9 ou l'administration de protéines Cas9 purifiées se sont également développées (Hwang et al., 2013).

En parallèle, il est possible, d'exprimer le sgRNA par un vecteur ADN, ou de les transférer directement sous forme d'ARN avec le système d'expression de la Cas9 choisi. (Cho et al., 2013; Hwang et al., 2013).

Le contrôle de la disparition ou de la modification des séquences ciblées dans les cellules produites est accessible par les techniques de séquençage classique et peut faire l'objet d'un référentiel de qualité.

Pour la transmission du système de modification CRISPR/Cas9 à la descendance cellulaire la méthode d'introduction est importante et fait l'objet de recherche : sous la forme d'ARNm, de sgRNA ou de protéine, il n'y a pas de transmission car la demi-vie de ces molécules est courte. L'utilisation de systèmes d'expression d'ADN, même non intégré, peut nécessiter une validation pour en vérifier la disparition. Les techniques de cette validation sont simples et sensibles.

Utilisations possibles

Ce système peut être utilisé pour générer des mutations ponctuelles ciblées, des délétions des conversions géniques ou des insertions par recombinaison homologue.

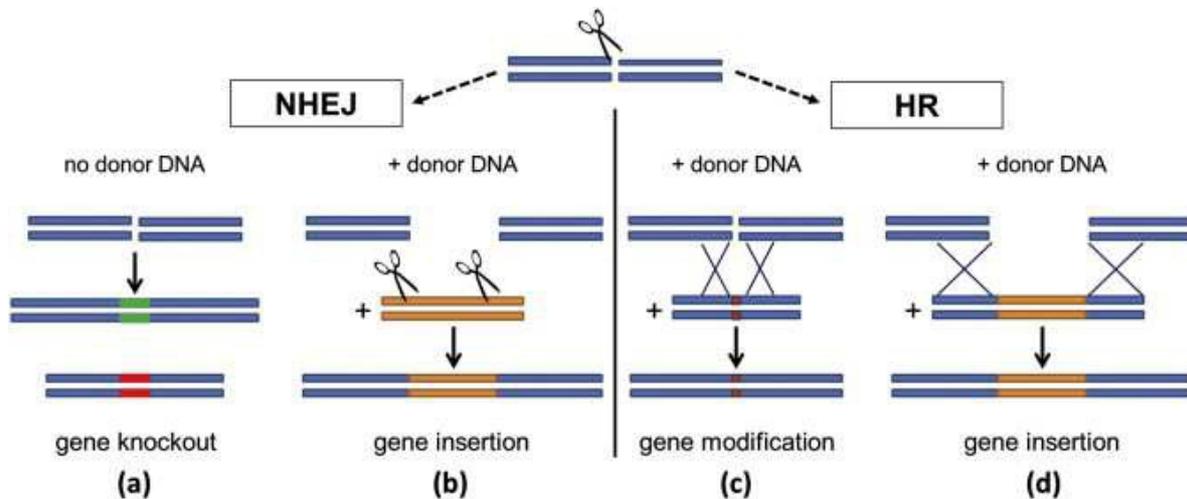


Figure 1 : Edition ciblée du génome avec les nucléases (Bortesi and Fischer, 2015).

Les coupures doubles brins induites par les nucléases peuvent être réparées soit par non-homologous end joining (NHEJ) soit par recombinaison homologue (HR). (a) La réparation par NHEJ résulte généralement en une insertion (vert) ou une délétion (rouge) de paires de bases aléatoires provoquant un KO du gène par décalage du cadre de lecture. (b) Si un ADN donneur est disponible (orange) et simultanément coupé par la même nucléase, il peut laisser des extrémités cohésives et permettre une insertion par NHEJ. (c) La recombinaison homologue avec un ADN donneur peut être utilisée afin de modifier un gène en introduisant une substitution nucléotidique précise ou (d) une insertion de gène.

Le système a été utilisé chez les plantes (Bortesi and Fischer, 2015), les animaux et les bactéries (Harrison et al., 2014) et, en posant des questions éthiques importantes, sur des embryons humains (Liang et al., 2015).

Il est intéressant de noter que d'autres applications reposant sur ce système d'interaction ciblée avec l'ADN sont en cours de développement. Elles visent à guider des protéines impliquées dans la régulation de la transcription (figure 2a), par modification de la méthylation de l'ADN ou de l'acétylation des histones par exemple (figure 2b). Ces techniques ne nécessitent pas le clivage de l'ADN et mettent en œuvre une protéine Cas9 doublement modifiée, par la perte de la fonction endonucléase et l'ajout d'un domaine fonctionnel (Maeder et al., 2013; Mali et al., 2013a).

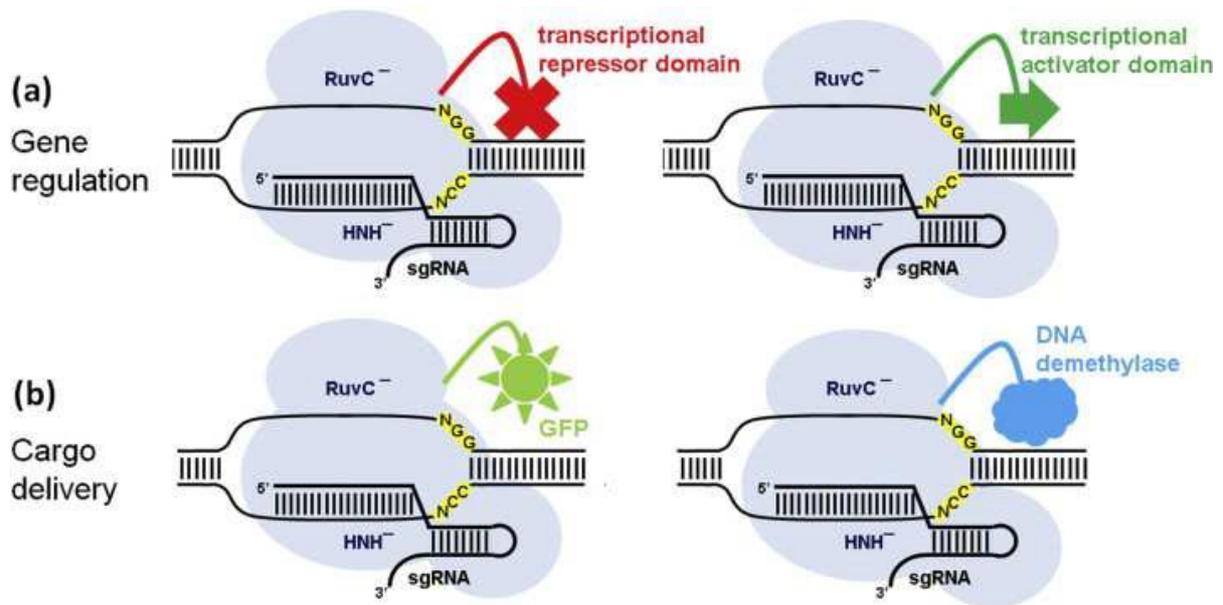


Figure 2 : Applications du système CRISPR/cas au delà de l'édition du génome (Bortesi and Fischer, 2015).

(a) Régulation génique. Une cas9 sans activité catalytique peut être fusionnée à un represser transcriptionnel (gauche) ou à un activateur transcriptionnel (droite). Lorsque cette protéine de fusion est recrutée par le sgRNA complémentaire du promoteur d'un gène, celui-ci peut ainsi être éteint ou exprimé. (b) Cargo delivery. Une cas9 sans activité catalytique peut être utilisée comme une protéine de liaison à l'ADN programmable pour délivrer diverses protéines dans des régions spécifiques du génome. Par exemple, une fusion avec une protéine fluorescente (gauche) permet de visualiser la structure ou la dynamique chromatinienne. La fusion avec une déméthylase (à droite) peut être utilisée pour de l'édition épigénétique du génome.

Avantages et contraintes par rapport aux techniques existantes

Plusieurs avantages caractérisent ce système. D'une part, le complexe moléculaire chargé de couper l'ADN est composé de molécules dont l'ingénierie est aujourd'hui aisée. L'activité de coupure de l'ADN repose notamment sur l'utilisation d'une protéine unique pour toutes les applications et ne requérant aucune modification particulière liée à la cible d'ADN qu'elle va couper. D'autre part, l'activité ciblée de ce complexe dépend d'un appariement de l'ARN avec un ADN complémentaire (hybridation type Watson-Crick) reposant sur des interactions moléculaires facilement prédictibles permettant une ingénierie facile du mécanisme de ciblage du complexe.

Bien que l'interaction ARN/ADN soit spécifique la coupure dans des sites différents de la cible (qui auraient la même séquence ou une séquence similaire) est possible. Néanmoins, la technique est récente et de nombreuses études ont proposé des méthodes pour en augmenter la spécificité (Cho et al., 2013; Cradick et al., 2013; Fu et al., 2013; Hsu et al., 2013). Il est à signaler que de récentes études de séquençage indiquent que ces coupures non-spécifiques dites « off-target » sont rares (Smith et al., 2014; Suzuki et al., 2014; Veres et al., 2014).

En contre-point, de nombreuses stratégies sont développées afin de réduire les coupures non souhaitées dans le génome notamment en se focalisant sur la structure de l'acide nucléique guide qui est un élément d'influence majeure sur cette spécificité (Cho et al., 2014), ou sur l'analyse de certains mésappariements qui semblent tolérés (Semenova et al., 2011). Ainsi ont été testés plus de 700 variants de sgRNA en parallèle, permettant la mise au point d'outils informatiques mis à disposition de la communauté scientifique pour mieux choisir les ARN guides (Hsu et al., 2013).

En parallèle, des variants de la protéine Cas9 ont été produits afin de ne générer que des coupures simple brin (nickase), par mutation du domaine nucléase (figure 3a) ou par remplacement de la fonction catalytique (figure 3b). La coupure double brin nécessite 2 sites physiquement proches, et donc deux sgRNA différents. Ceci limite significativement (de 50 à 1500 fois) les effets des coupures non souhaitées, qui sont physiologiquement réparées comme le sont les fréquentes ruptures de brin (review : (Bortesi and Fischer, 2015)).

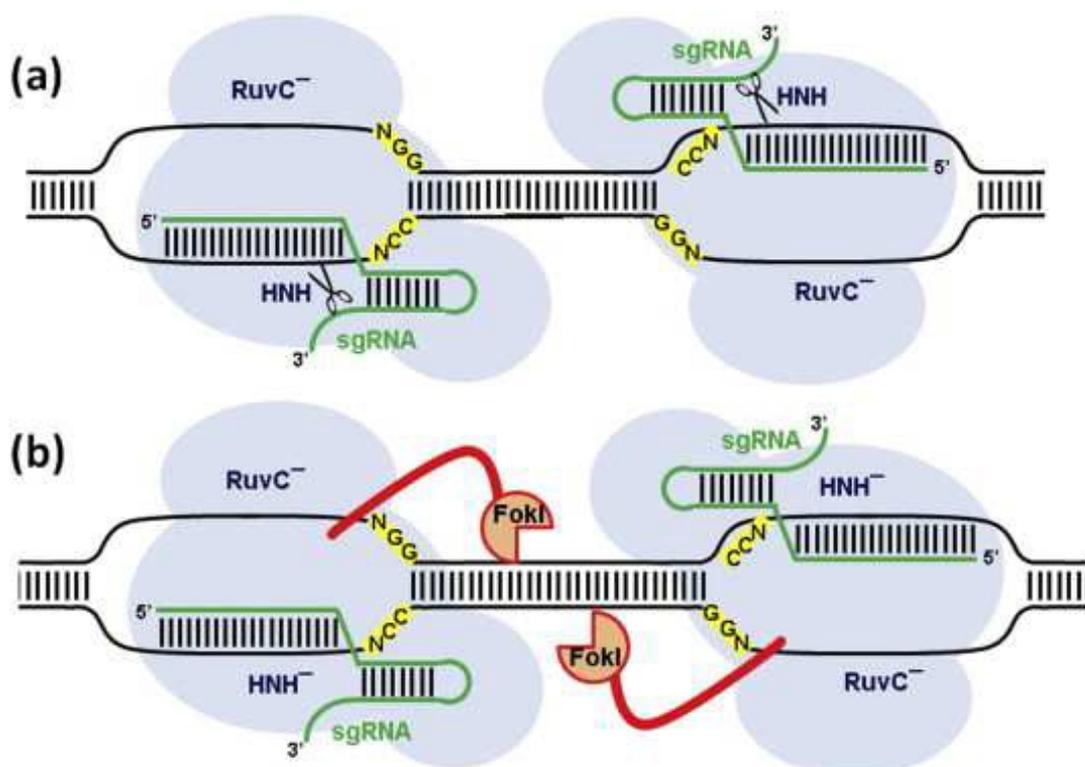


Figure 3 : Stratégies pour augmenter la spécificité du système CRISPR/Cas9 (Bortesi and Fischer, 2015).

(a) Utilisation d'une paire de nickases Cas9 décalées. La mutation D10A inactive le domaine endonucléasique RuvC de façon à ce que la Cas9 ne puisse cliver que le brin d'ADN complémentaire au sgRNA. L'usage simultané de deux nickases Cas9 liant deux séquences opposées génère une coupure échelonnée sur les 2 brins. (b) Fusion de Cas9 et FokI. Un variant de Cas9 sans activité (RuvC⁻ HNH⁻) peut être fusionnée au domaine nucléasique de FokI. Le clivage par FokI dépend de la dimérisation de l'enzyme qui doit se lier sur 2 sites précisément disposés sur le génome. Cette approche réduit grandement le nombre de coupures dites « off target » possibles. Des approches d'évolution moléculaire donnent aussi des protéines moins propices à une coupure hors cible (voir plus bas).

État de l'art (non exhaustif)

Phased'avancement:

Selon les espèces, les phases d'avancement sont variables.

Chezesvégétaux :

Le stade 1, correspondant à l'optimisation du ciblage du gène et à la transformation de l'espèce, est en cours pour un grand nombre d'organismes et dans un contexte de recherche essentiellement.

Le stade 2, correspondant à la génération d'organismes évaluables sur le plan phénotypique, reste limitée sur le plan végétal, les méthodes d'administration des protéines et des sgRNA sont encore immatures pour proposer des produits commerciaux.

Le stade 3, correspondant au stade de l'essai au champ : pas d'essai connu à ce jour.

Le stade 4, correspondant au stade de la soumission AMM, pré-marketing : pas de demande connue à ce jour.

Chezesautresorganismes :

Le stade 1, correspondant à l'optimisation du ciblage du gène et à la transformation de l'espèce, est en cours pour un grand nombre d'organismes et dans un contexte de recherche essentiellement.

Le stade 2, correspondant à la génération d'organismes évaluables sur le plan phénotypique, est effectif sur le plan animal grâce à la disponibilité de cellules souches de type ES ou iPSC et de la capacité à trier facilement les œufs fécondés pour de nombreuses espèces.

Le stade 3, correspondant au stade de l'essai vétérinaire, ou d'essais cliniques :

Plusieurs types de modèles animaux sont disponibles et très utilisés en laboratoires pour les études de physiologie. Il n'y a pas d'application « agronomique » envisagée, quand bien même certains traits seraient intéressants, pour la génération de culard par exemple. En thérapie génique, les stratégies reposant sur la recombinaison homologue seraient les plus intéressantes mais cette phase se heurte actuellement au problème d'administration de l'ADN modèle de conversion. Dans des objectifs de mutagenèse, l'évolution de l'essai VIH1/CCR5 vers une utilisation des CRISPR/Cas9, qui pourrait faciliter cette approche est à court terme envisageable mais dépend essentiellement des résultats de l'essai utilisant la technique de mutagenèse ciblée par les ZFN.

Le stade 4, correspondant au stade de la soumission AMM, pré-marketing : pas de demande connue à ce jour.

Recherche fondamentale :

Organisme	Références	Type de SDN	Cellule en culture ou Organisme entier
Axolotl	Flowers et al., 2014	SDN1	Organisme
Grenouille	Blitz et al., 2013, Nakayama et al., 2013 Guo et al., 2014	SDN1	Organisme
Homme	Review Sander and Joung, 2014	SDN1 et SDN2 ou 3	Cellule
Poisson (Medaka ou Tilapia)	Ansai and Kinoshita, 2014 ; Li et al., 2014	SDN1	Organisme
Souris	Review Sander and Joung, 2014	SDN1 et SDN2 ou 3	Organisme et cellule
Singe	Niu et al., 2014	SDN1	Organisme
Porc	Hai et al., 2014 ; Sato et al., 2014	SDN1	
Lapin	Yang et al.,	SDN1	Organisme
Rat	Li et al., 2013, 2014 ; Ma et al., 2014	SDN1 et SDN2 ou 3	Organisme et cellule
Poisson zèbre	Review Auer et al., 2014	SDN1 et SDN2 ou 3	Organisme
Puces d'eau	Nakanishi et al., 2014	SDN1	Organisme
Drosophile	Review Gratz et al., 2013 ; Bassett and Liu, 2014	SDN1 et SDN2 ou 3	Organisme et cellule
Nématode	Review Waajers and Boxem, 2014	SDN1 et SDN2 ou 3	Organisme
B. mori	Wang et al., 2013 ; Daimon et al., 2014 ; Liu et al., 2014 ; Ma et al., 2014 ; Wei et al., 2014	SDN1 et SDN2 ou 3	Organisme et cellule
Maïs	Liang et al., 2014	SDN1	Organisme
Hépatique	Sugano et al., 2014	SDN1	Organisme
Riz	Review Belhaj et al., 2013	SDN1	Organisme
Sorgho	Jiang et al., 2013	SDN1	Organisme
Orange	Jia and Wang, 2014	SDN1	Organisme
Arabidopsis	Review Belhaj et al., 2013	SDN1 et SDN2 ou 3	Organisme
Tabac	Review Belhaj et al., 2013	SDN1 et SDN2 ou 3	Organisme
Blé	Upadhyay et al., 2013	SDN1	Cellule

Tableau 1 : Organismes ayant été modifiés par l'utilisation du système CRISPR/Cas9 (Harrison et al., 2014).

Revue de référence :

(Bortesi and Fischer, 2015; Harrison et al., 2014; Mali et al., 2013a; Richter et al., 2013)

Recherche appliquée/industrie/médicale

Beaucoup de projets notamment en thérapie Génique, modification de plantes et en lutte contre vecteurs de maladie (moustiques).

Intérêt des entreprises

Les entreprises ont exprimé leur intérêt pour la technologie car le coût est faible, les applications très importantes et nombreuses, et la mise en place simple.

Remarques

Détection de la modification introduite

La détection de la mutation induite sera toujours détectable quelle que soit la technique utilisée : mutation ponctuelle dirigée, conversion génique, KO par NHEJ ou la recombinaison homologue. En revanche, l'analyse de la mutation ne donnera pas d'indications quant à la méthode utilisée pour l'obtenir. De plus, il sera impossible par cette analyse de définir s'il s'agit d'un variant naturel, d'un variant obtenu par manipulation génétique ou du résultat d'un croisement.

Dans le cas de l'insertion ciblée de gènes (transgénèse, cisgénèse, intragénèse), la séquence introduite ainsi que ses bordures seraient aisément caractérisables.

Transmission génétique

Dès lors que les lignées germinales ou des cellules souches embryonnaires sont modifiées la modification pourra être transmissible verticalement.

Une question éthique liée aux cibles cellulaires, les cellules souche embryonnaires totipotentes, se pose. L'utilisation des techniques de modification ciblée des génomes pourrait favoriser l'essor d'une thérapie germinale, qui est actuellement interdite.

Spécificité de la modification (Effets dits «Off target»)

C'est une question importante que les évolutions de la technique visent à améliorer. Les coupures non spécifiques sont observées mais peuvent s'avérer difficilement quantifiables. Chez l'animal, le séquençage complet des génomes rend possible la détection et la caractérisation des mutations hors cible. Ces événements ne sont pas fréquents. Pour l'interprétation de ces résultats, la connaissance de la variation naturelle c'est-à-dire la

fréquence des mutations spontanées qui surviennent à chaque génération, sera à considérer. Le phénotype reste également un excellent indicateur.

Comme pour les autres méthodes mettant en œuvre des nucléases, l'évaluation et la détection des coupures non spécifiques restent une question. Il s'agit là d'un axe de recherche et développement très actif, deux récentes publications font état d'une réduction en deçà du seuil de détection de ces effets hors cible (Kleinstiver et al., 2016; Slaymaker et al., 2016).

Chez les plantes, il est possible, par croisements successifs, d'éliminer les mutations non souhaitées comme cela se fait en sélection traditionnelle.

Pour la thérapie génique somatique, il ne sera néanmoins pas possible de trier les cellules corrigées. D'importantes recherches visent à diminuer les mutations hors cible.

Pour la modification de cellules souches thérapeutiques et pour les animaux de rente, une sélection des cellules serait possible.

Bibliographie

Auer, T.O., and Del Bene, F. (2014). CRISPR/Cas9 and TALEN-mediated knock-in approaches in zebrafish. *Methods San Diego Calif* 69, 142–150.

Bortesi, L., and Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol. Adv.* 33, 41–52.

Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M., and Kim, J.-S. (2013). Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 31, 230–232.

Cho, S.W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H.S., Bae, S., and Kim, J.-S. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* 24, 132–141.

Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., et al., (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823.

Cradick, T.J., Fine, E.J., Antico, C.J., and Bao, G. (2013). CRISPR/Cas9 systems targeting β -globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res.* 41, 9584–9592.

Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K., and Sander, J.D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* 31, 822–826.

Harrison, M.M., Jenkins, B.V., O'Connor-Giles, K.M., and Wildonger, J. (2014). A CRISPR view of development. *Genes Dev.* 28, 1859–1872.

Hisano, Y., Sakuma, T., Nakade, S., Ohga, R., Ota, S., Okamoto, H., Yamamoto, T., and Kawahara, A. (2015). Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Sci. Rep.* 5, 8841.

Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., et al., (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 31, 827–832.

Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Kaini, P., Sander, J.D., Joung, J.K., Peterson, R.T., and Yeh, J.-R.J. (2013). Heritable and Precise Zebrafish Genome Editing Using a CRISPR-Cas System. *PLoS ONE* 8, e68708.

Kimura, Y., Hisano, Y., Kawahara, A., and Higashijima, S. (2014). Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Sci. Rep.* 4, 6545.

Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z., and Keith Joung, J. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*.

Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., Lv, J., Xie, X., Chen, Y., Li, Y., et al., (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes. *Protein Cell*.

Maeder, M.L., Linder, S.J., Cascio, V.M., Fu, Y., Ho, Q.H., and Joung, J.K. (2013). CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat. Methods* 10, 977–979.

Mali, P., Esvelt, K.M., and Church, G.M. (2013a). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat. Methods* 10, 957–963.

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013b). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823–826.

Richter, H., Randau, L., and Plagens, A. (2013). Exploiting CRISPR/Cas: Interference Mechanisms and Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 14518–14531.

Semenova, E., Jore, M.M., Datsenko, K.A., Semenova, A., Westra, E.R., Wanner, B., van der Oost, J., Brouns, S.J.J., and Severinov, K. (2011). Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 10098–10103.

Slaymaker, I.M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D.A., Yan, W.X., and Zhang, F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* 351, 84–88.

Smith, C., Gore, A., Yan, W., Abalde-Atristain, L., Li, Z., He, C., Wang, Y., Brodsky, R.A., Zhang, K., Cheng, L., et al., (2014). Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell* 15, 12–13.

Annexe 2 : Fiches « Nouvelles techniques » issues de la première étape de réflexion du HCB

Suzuki, K., Yu, C., Qu, J., Li, M., Yao, X., Yuan, T., Goebel, A., Tang, S., Ren, R., Aizawa, E., et al., (2014). Targeted gene correction minimally impacts whole-genome mutational load in human-disease-specific induced pluripotent stem cell clones. *Cell Stem Cell* 15, 31–36.

Veres, A., Gosis, B.S., Ding, Q., Collins, R., Ragavendran, A., Brand, H., Erdin, S., Cowan, C.A., Talkowski, M.E., and Musunuru, K. (2014). Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell* 15, 27–30.

FICHE NOUVELLES TECHNIQUES

MUTAGENÈSE DIRIGÉE PAR OLIGONUCLÉOTIDES

Présentation générale de la technique (Grand public)

Cette technique vise à l'introduction de mutations ponctuelles ciblées. Elle s'appuie sur l'utilisation d'une courte séquence d'acide nucléique quasi-identique à la séquence ciblée mais possédant la mutation recherchée. L'acide nucléique est introduit dans la cellule de l'hôte où, selon un mode mal connu, les mécanismes de réparation physiologiques de la cellule pourraient favoriser la substitution de la séquence du génome par celle de l'oligonucléotide. Les oligonucléotides ne s'intègrent pas dans le génome, leur présence n'est donc que transitoire³³.

³³ Les oligonucléotides modifiés chimiquement ne s'intègrent pas, pour les autres oligonucléotides, les événements d'intégration sont rarissimes et pourront être détectés par NGS.

Principe et fonctionnement au niveau cellulaire et moléculaire

Cette technique recouvre 2 approches (RDO pour chimeric RNA/DNA oligonucleotides et SDO pour single stranded DNA oligonucleotide). RDO et SDO fonctionneraient suivant les 2 mêmes étapes :

- Un appariement entre l'oligonucléotide et la séquence génomique homologue provoquant une structure de type D-loop
- L'activation des systèmes de réparation de l'ADN.

Cependant ces 2 approches font intervenir des acteurs moléculaires différents. La SDO serait plus reproductible que la RDO mais présente la même fréquence de réparation génique.

Ces techniques ne font intervenir comme composé exogènes que les oligonucléotides chimériques ou modifiés et les éléments de transfection.

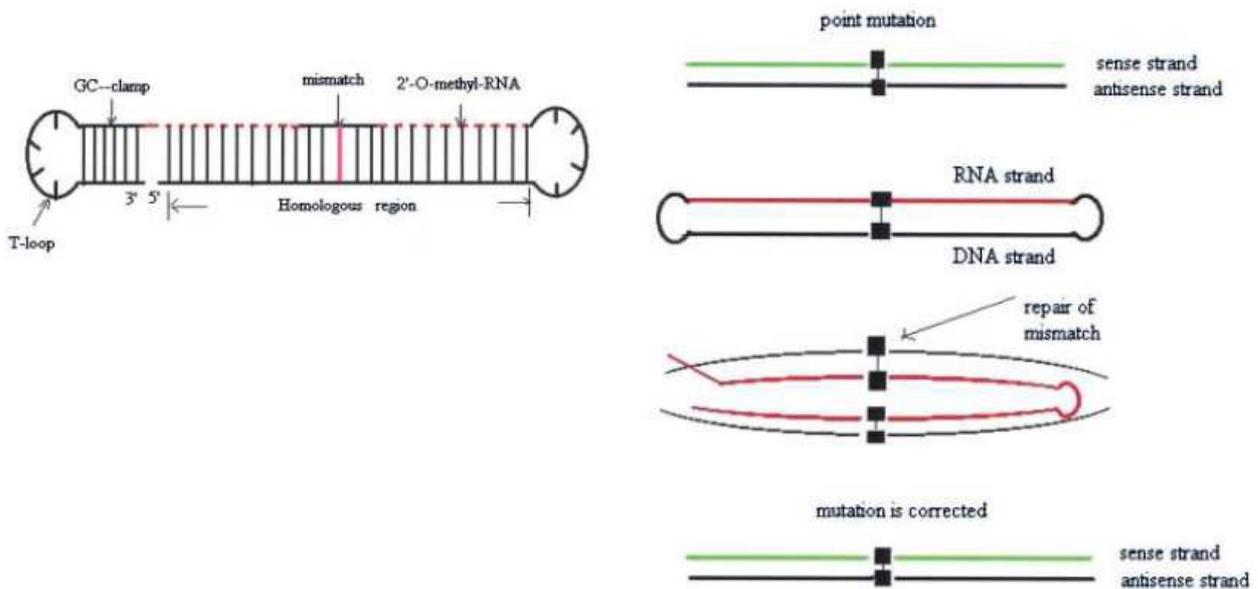


Figure 1 : Diagramme de la structure du RDO (gauche) mécanisme du RDO (droite) (Liang et al., 2002)

La technique permet d'introduire une mutation ponctuelle, stable et transmissible aux cellules filles. Lorsqu'une plante est obtenue après transformation d'une cellule somatique ou régénération à partir d'une cellule transformée, le caractère se transmet de façon mendélienne.

Modalités de mise en œuvre

Le principe de cette technique repose sur l'introduction d'un oligonucléotide dans les cellules hôtes. De nombreuses molécules ou mélanges moléculaires sont en cours d'essais pour améliorer la vectorisation qui fonctionne relativement bien *in vitro* mais très peu sur des organismes entiers (Liang et al., 2002).

Utilisations possibles

Ces techniques peuvent être utilisées pour introduire une mutation ponctuelle dans un organisme cible. Elles ne permettent pas l'introduction de séquences nucléiques nouvelles de grande taille. Les utilisations pratiques en amélioration des plantes peuvent donc être limitées. Par exemple, l'introduction de mutations en codon de type « STOP » permet l'extinction de gènes. Comme les autres techniques de recombinaison homologue, la technique peut être utilisée de façon efficace si elle est couplée à la recherche de SNP liés à des QTL.

Avantages et contraintes par rapport aux techniques existantes

La fréquence de mutation reste très faible et assez variable en fonction de l'organisme utilisé

- Chez les plantes :
la fréquence de réparation est extrêmement variable.
De plus, la fréquence de mutation spontanée de certaines plantes en particulier (tabac et colza) peut surestimer l'effet réel résultant de l'utilisation du RDO. En effet, chez ces plantes, un taux de réparation de l'ordre de 2×10^{-7} a été observé (extrêmement proche de la fréquence de mutation spontanée). Ce taux peut être augmenté d'un facteur 10 à 20 en fonction de l'état physiologique des cellules testées.
Cette technique peut être complétée par l'obtention de cassures simples brins sur l'ADN de façon aléatoire ou spécifique (cf ZFN, TALEN et CRISPR).
- chez les animaux :
la fréquence de conversion varie elle aussi beaucoup en fonction des cellules testées, des conditions de culture des cellules et de la localisation du gène ciblé sur le chromosome.
- chez les micro-organismes :
la reproduction plus aisée permet une sélection des mutants et rend moins limitant ce paramètre.

En conséquence, cette technique présente peu d'avantage par rapport aux techniques mettant en œuvre des nucléases (ZFN, TALEN, CRISPR...) qui sont plus fiables, plus efficaces et plus souples, si ce n'est son coût très faible, sa vectorisation simple.

État de l'art (non exhaustif)

Phased'avancement :

Chezesvégétaux :

Le stade 1, correspondant à l'optimisation du ciblage du gène et à la transformation de l'espèce, est en cours pour un grand nombre d'espèces.

Le stade 2, correspondant à la génération d'organismes qui sont évaluables sur le plan phénotypique, est accessible sur le plan végétal.

Le stade 3, correspondant au stade de l'essai au champ :

Il y a au moins un projet d'application « agronomique » envisagé avec recherche de zones pour des essais au champ. Chez les animaux, dans le cadre de l'élevage, cette technique est associée à la recherche de SNP liés à des QTLs. Ainsi les sélectionneurs ciblent les mutations ponctuelles capables de modifier un trait d'intérêt mais aucune commercialisation n'est encore prévue. D'autres preuves de concept ont été réalisées (Maïs, tabac, riz, blé...)

Le stade 4, correspondant au stade de la soumission AMM, pré-marketing :

La compagnie CIBUS commercialise déjà au Canada un Colza tolérant aux herbicides de type sulfonylurée obtenu par un procédé appelé RTDS (Rapid Trait DevelopmentSystem).

Chezesautresorganismes :

Le stade 1, correspondant à l'optimisation du ciblage du gène et à la transformation de l'espèce, est en cours pour un grand nombre d'espèces.

Le stade 2, correspondant à la génération d'organismes évaluables sur le plan phénotypique, est accessible pour les levures.

Le stade 3, correspondant au stade de l'essai clinique :

Chez la levure il existe de nombreuses utilisations en laboratoire mais il y a peu d'information quant à une utilisation industrielle.

Le stade 4, correspondant au stade de la soumission AMM, pré-marketing : pas de demande connue.

Recherchefondamentale :

Réalisation (organismes testés)

Cette technique de mutagenèse a été mise au point chez les animaux, puis transférée aussi bien aux levures (deleto perfetto) qu'aux plantes (Beetham et al., 1999) (maïs, tabac, colza, riz et blé) (Kochevenko and Willmitzer, 2003; Okuzaki and Toriyama, 2004; Zhu et al., 1999)

Revue de référence

(Igoucheva et al., 2004)

Remarques

Détection de la modification introduite

Cette technique permettant l'obtention de mutations ponctuelles qui pourraient être obtenues par des techniques classiques ou par sélection, il n'est pas possible d'en détecter l'utilisation. La traçabilité documentaire est la seule disponible.

Transmission

La mutation, si elle est obtenue dans une lignée germinale, est transmissible. Toute mutation, si le fardeau génétique est important, pourra être facilement éliminée du génome de l'hôte par le processus de sélection naturelle.

Spécificité de la modification (Effets dits «Off target»)

Les mutations non ciblées ne peuvent être exclues mais peuvent être estimées comme peu probables compte tenu de la faible fréquence des mutations ciblées. Elles ne peuvent probablement pas être discernées de mutations ponctuelles aléatoires.

Bibliographie

Beetham, P.R., Kipp, P.B., Sawycky, X.L., Arntzen, C.J., and May, G.D. (1999). A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 8774–8778.

Breyer, D., Herman, P., Brandenburger, A., Gheysen, G., Remaut, E., Soumillion, P., Van Doorselaere, J., Custers, R., Pauwels, K., and Sneyers, M. (2009). Commentary: Genetic modification through oligonucleotide-mediated mutagenesis. A GMO regulatory challenge? *Environ. Biosafety Res.* 8, 57–64.

Igoucheva, O., Alexeev, V., and Yoon, K. (2004). Oligonucleotide-directed mutagenesis and targeted gene correction: a mechanistic point of view. *Curr. Mol. Med.* 4, 445–463.

Kochevenko, A., and Willmitzer, L. (2003). Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-based site-specific modification of the tobacco acetolactate synthase gene. *Plant Physiol.* 132, 174–184.

Laible, G., Wagner, S., and Alderson, J. (2006). Oligonucleotide-mediated gene modification and its promise for animal agriculture. *Gene* 366, 17–26.

Liang, L., Liu, D.-P., and Liang, C.-C. (2002). Optimizing the delivery systems of chimeric RNA-DNA oligonucleotides: Beyond general oligonucleotide transfer. *Eur. J. Biochem.* 269, 5753–5758.

Okuzaki, A., and Toriyama, K. (2004). Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Rep.* 22, 509–512.

Zhu, T., Peterson, D.J., Tagliani, L., Clair, G.S., Baszczyński, C.L., and Bowen, B. (1999). Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 8768–8773.

FICHE NOUVELLES TECHNIQUES

MODULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES PAR RdDM

Présentation générale de la technique (Grand public)

Certains ARN cellulaires agissent par un mécanisme appelé l'interférence induite par les ARN. Ce mécanisme physiologique initialement découvert chez un nématode modèle (petit ver retrouvé dans le sol) et chez les plantes, a été identifié dans la majorité des règnes, y compris les mammifères.

L'interférence ARN est un phénomène par lequel une molécule d'ARN, généralement de petite taille, établit une liaison avec une autre molécule d'acide nucléique ou un complexe de protéines et d'acides nucléiques (ADN ou ARN) afin d'en modifier l'activité, le plus souvent par inhibition. Ces mécanismes sont naturels et ont une fonction de régulation cellulaire.

La RdDM (RNA-dependent DNA Methylation) est le mécanisme cellulaire qui utilise de petits ARN interférents (siRNA) pour modifier l'expression de gènes par méthylation d'une séquence spécifique d'ADN, sans modifier sa séquence nucléotidique. C'est ce que l'on appelle un changement dit épigénétique. La technique de la RdDM, qui utilise ce mécanisme naturel, permet en particulier d'éteindre l'expression d'un gène spécifique. L'extinction du gène obtenue par méthylation peut être transmise à la descendance sur plusieurs générations, elle finit le plus souvent par être perdue.

Principe et fonctionnement au niveau cellulaire et moléculaire

L'extinction de gène par méthylation de l'ADN (RdDM) peut être obtenue dans une cellule ou dans un organisme par l'introduction d'un gène, qui, une fois transcrit, donnera un ARN double-brin (dsRNA) qui par maturation donnera l'ARN interférent. Si ces ARN interférents reconnaissent un promoteur, ils peuvent spécifiquement induire sa méthylation et induire l'extinction du gène contrôlé par ce promoteur (inhibition de la transcription du gène). Le profil de méthylation peut se maintenir, même après élimination de l'ARN interférent. L'effet d'extinction peut diminuer au fur et à mesure des générations, mais l'expression du gène peut aussi ne jamais être restaurée complètement.

Modalités de mise en œuvre

Le transfert des ARN interférents est un point clé de leur utilisation :

- Les ARN interférents obtenus par synthèse chimique sont administrés sous forme de complexes avec des molécules permettant leur entrée cellulaire. La durée de l'effet de ces ARN dépend de la cible et de la stabilité des ARN transférés. Le plus souvent, l'effet est transitoire et nécessitera d'éventuelles ré-administrations.
- Les ARN interférents exprimés en cellule peuvent, selon le mode choisi, avoir une expression prolongée, par intégration du vecteur dans les cellules ciblées, ou transitoire, mais plus durable que celle obtenue par transfert d'ARN. Les vecteurs utilisés sont très nombreux : plasmides ou vecteurs viraux.
- Selon le mode de vectorisation, les utilisations pourront avoir lieu *in vitro* (cellules en culture) ou *in vivo* (animaux ou plantes entiers ou organes spécifiques).
- Chez les plantes, l'extinction de gène par méthylation de l'ADN est généralement réalisée par transgénèse, avec une construction codant des petits ARN en épingle à cheveux (shRNA). Par l'obtention d'un ségrégant négatif (Voir fiche), il est possible d'obtenir une plante ne comportant plus le transgène tout en conservant la modification de méthylation de la plante OGM mère. La stabilité de cette modification est variable.

Utilisations possibles

Les objectifs recherchés sont divers et concernent tous les organismes, des unicellulaires aux eucaryotes supérieurs (plantes et animaux), à titre d'exemple et sans limite :

- Lutte anti-virale (HIV³⁴), anti-bactérienne, anti-parasitaire...
- Inactivation de gènes :

³⁴ Bobbin, M.L., Burnett, J.B., Rossi, J.J. (2015). RNA interference approaches for treatment of HIV-1 infection. *Genome Med.* 7(1): 50.

- Pour la lutte contre le cancer,
- Pour les maladies chroniques de type inflammatoire ou autres,
- Pour l'obtention de modèles de maladies,
- Pour la compréhension de phénomènes physiologiques,
- Pour induire des modifications métaboliques.

Avantages et contraintes par rapport aux techniques existantes

Il n'y a pas de modification de séquence. La limite de cette technique pour certaines applications pourrait être que les changements épigénétiques désirés disparaissent, sans que la durée d'action ne soit prédictible. Cette extinction peut aussi être considérée comme un avantage si l'effet recherché est transitoire.

État de l'art (non exhaustif)

Phased'avancement:

Chezlesvégétaux :

Le stade 1, correspondant à l'optimisation du gène et à la transformation de l'espèce : nombreuses études en cours.

Le stade 2, correspondant à la génération d'organismes qui sont évaluables sur le plan phénotypique : nombreuses études en cours.

Le stade 3, correspondant au stade de l'essai au champ : pas d'étude connu.

Le stade 4, correspondant au stade de la soumission AMM, pré-marketing : pas de demande connue.

Chezlesanimaux :

Les mécanismes moléculaires de la RdDM ne sont pas établis chez l'animal. Cependant, des modifications épigénétiques chez l'animal sont tout de même possibles grâce à l'utilisation d'une CRISPR ou d'une TALEN fusionnée à une déméthylase (voir p39, figure 2).

Dans ce cadre, le stade 1, correspondant à l'optimisation du gène et à la transformation de l'espèce, est en cours.

Le stade 2, correspondant à la génération d'organismes qui sont évaluables sur le plan phénotypique : pas d'étude connue.

Le stade 3, correspondant au stade de l'essai clinique : pas d'essai connu.

Le stade 4, correspondant au stade de la soumission AMM, pré-marketing : pas de demande connue.

Revue de référence

(Matzke et al.,
2014)

Remarques

Détection de la modification

Si l'ARN interférent est exprimé via l'insertion d'un transgène, celui-ci peut être détecté.

Il existe des méthodes de biologie moléculaire pour distinguer l'ADN méthylé d'un ADN non méthylé. Cependant, il n'est pas possible de distinguer une méthylation apparue naturellement d'une méthylation induite par RdDM.

Contraintes

Les points techniques et clés à maîtriser :

- la spécificité du ciblage mérite une validation expérimentale et peut être affinée par un contrôle d'expression.
- la durée de l'effet.

Bibliographie

Bobbin, M.L., Burnett, J.B., Rossi, J.J. (2015). RNA interference approaches for treatment of HIV-1 infection *Genome Med.* 7(1): 50.

Matzke, M.A., Mosher, R.A. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat Rev Genet.* 15(6):394-408.

FICHE NOUVELLES TECHNIQUES

AGROINFILTRATION

(AGROINFILTRATION STRICTO SENSU ET AGROINOCULATION)

Présentation générale de la technique (Grand public)

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie classiquement utilisée en biotechnologies comme vecteur de transfert de matériel génétique dans le génome d'une plante. La bactérie est génétiquement modifiée (recombinante) afin de porter le gène d'intérêt, puis est mise en contact avec des cellules de plante dans lesquelles elle transfère le gène (transgène). Il est ensuite possible d'obtenir une plante génétiquement modifiée à partir de ces cellules (voir fiche Transgénèse classique).

Cette bactérie peut aussi être utilisée avec un autre objectif : l'agroinfiltration. Dans ce cas, les bactéries recombinantes sont mises en contact, selon divers procédés, avec les cellules de tissus d'une plante (généralement les feuilles). En infectant ces tissus et en se multipliant, les bactéries expriment transitoirement le ou les gènes d'intérêts. En pratique, cette technique est utilisée dans un objectif de production de protéines ou de molécules d'intérêt. Celles-ci sont le plus souvent purifiées après récolte et broyage des tissus de la plante. Cette technique permet aussi l'étude de la fonction de gènes inconnus.

Cette fiche traite de :

- l'agroinfiltration stricto sensu, effectuée dans des tissus somatiques (composés de cellules incapables de reproduction, typiquement des feuilles) avec un matériel génétique sans capacité de multiplication, dans le but d'obtenir une expression transitoire.
- L'agroinfection ou agroinoculation, effectuée dans des tissus somatiques avec un matériel répliatif (gène d'intérêt contenu dans un génome viral entier), dans le but d'obtenir une expression transitoire dans la plante entière.

La technique appelée « floral dip », par laquelle des fleurs ou des inflorescences sont agroinfiltrées, dans le but d'obtenir la transformation stable de quelques embryons, qui seront sélectionnées après germination, n'est pas abordée ici, son statut de production d'OGM étant clairement établi.

Principe et fonctionnement au niveau cellulaire et moléculaire

L'agroinfiltration stricto sensu est une technique impliquant l'utilisation comme vecteur de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* introduit de manière mécanique, in vivo ou ex vivo, dans un tissu végétal, et aboutissant à l'expression transitoire d'un ou plusieurs gènes d'intérêt dans les cellules végétales agroinfiltrées.

Techniquement, l'agroinfiltration consiste en l'introduction intratissulaire, à l'aide d'une seringue, d'une suspension d'agrobactéries comportant un plasmide « désarmé³⁵ » sur lequel se trouvent les gènes d'intérêt à transmettre, dans les feuilles d'une plante (figure 1). La plante la plus utilisée est le tabac (*Nicotiana benthamiana*). Une alternative est l'utilisation d'une pompe à vide pour infiltrer la suspension bactérienne dans les tissus végétaux (figure 2). La combinaison de ces deux méthodes peut également être utilisée.



Figure 1 : Agroinfiltration de feuilles de *Nicotiana benthamiana* avec *Agrobacterium tumefaciens*, à l'aide d'une seringue. Les agrobactéries portant les gènes d'intérêts sont en suspension dans un tampon d'infiltration. Une blessure est faite sur la face inférieure des feuilles (A). Les agrobactéries sont ensuite infiltrées dans l'espace interstitiel de la feuille à l'aide de la seringue, à l'endroit de la blessure (B et C) (Leuzinger et al., 2013).

³⁵ Le Plasmide Ti est naturellement présent dans la bactérie et comporte des gènes de virulence responsables de la pathogénicité de la bactérie. Ici, la forme désarmée correspond à un plasmide dépourvu des gènes de synthèse de phytohormones.



Figure 2 : Infiltration sous vide de feuilles de tabac avec *Agrobacterium tumefaciens*. Les agrobactéries portant les gènes d'intérêts sont en suspension dans un tampon d'infiltration déposé dans une cuve. Cette dernière est ensuite placée dans un dessiccateur, lui-même connecté à une pompe à vide (A). Un plant de tabac (de 6 semaines) est placé dans dessiccateur (B), de façon à ce que le système foliaire soit immergé dans la suspension bactérienne (C). L'agroinfiltration est obtenue en appliquant le vide dans le dessiccateur (Leuzinger et al., 2013).

Une fois infiltrées, les agrobactéries se trouvent dans l'espace intercellulaire, elles n'entrent pas dans les cellules végétales. Une ou plusieurs copies de l'ADN-T (ADN de transfert) sont transférées dans les cellules végétales de la zone injectée. Ces ADN-T sont utilisés comme matrice de transcription par la machinerie cellulaire, les ARN produits sont traduits en protéines. L'ADN-T n'est pas nécessairement répliqué, ni intégré dans le génome de la cellule.

L'intégration de l'ADN-T dans le génome des cellules végétales est rare, mais peut néanmoins se produire dans quelques cellules de la zone agroinfiltrée (Jia et al., 2007). Cependant, le but de l'agroinfiltration stricto sensu n'est absolument pas de régénérer une plante entière à partir de ces cellules génétiquement modifiées qui seront détruites en fin d'opération.

Généralement, l'expression est limitée à la zone injectée ; en effet, les agrobactéries restent localisées dans la zone infiltrée, où elles peuvent se multiplier si les conditions sont favorables. Des mouvements de bactéries vers des zones non infiltrées et notamment vers des organes de reproduction (avec contamination potentielle de graines) sont concevables mais restent très peu probables. L'intégration de l'ADN-T dans le génome de cellules germinales est donc théoriquement possible mais très improbable. Cependant, les données pour évaluer rigoureusement la fréquence de ces événements sont manquantes. L'utilisation de cette technique sur des plantes entièrement broyées, récoltées avant floraison, permet d'éviter le risque de transmission.

Dans le cas de l'agroinfection ou agroinoculation, en conditions *in vivo*, l'ADN-T peut contenir un matériel répliatif (génom viral entier) dans le but d'obtenir une expression en dehors de la zone agroinfiltrée, voire dans toute la plante.

Modalités de mise en œuvre

Ce point est indissociable de la technique et est donc décrit plus haut.

Utilisations possibles

Cette technique est utilisée :

- à des fins de production de protéines ou de molécules d'intérêt (Fischer et al., 2012 ; Rybicki, 2014) ;
- en recherche fondamentale :
 - pour étudier les interactions plante-pathogène, en clonant notamment des génomes entiers de virus ou des réplicons dans l'ADN-T ;
 - pour sélectionner des plantes résistantes ou tolérantes à un pathogène, avec une potentielle application dans des programmes de sélection variétale (agroinfiltration avec des gènes spécifiques de pathogènes, ou l'effet sur le phénotype de la plante et la résistance/tolérance sont évalués) ;
 - pour analyser la fonction de gènes encore inconnus (notamment par extinction de gène induite par virus / Virus-Induced Gene Silencing (VIGS), ou par interférence) ;
 - Pour tester la fonctionnalité d'une construction génique.

Avantages et contraintes par rapport aux techniques existantes

L'agroinfiltration est une approche rapide pour l'expression transitoire de gènes dans les plantes. Les avantages de l'agroinfiltration, par rapport à la transgénèse classique, sont la facilité de mise en œuvre de l'expérimentation, la rapidité de l'expression des gènes étudiés et le haut niveau d'expression atteint.

État de l'art (non exhaustif)

Phased'avancement :

Chezesvégétaux :

Le stade 1, correspondant à l'optimisation du gène et à la transformation de l'espèce : nombreuses études en cours.

Le stade 2, correspondant à la génération d'organismes qui sont évaluables sur le plan phénotypique : nombreuses études en cours.

Le stade 3, correspondant au stade d'essai au champ : pas d'essai connu.

Le stade 4, correspondant au stade de la soumission AMM, pré-marketing : il existe des projets de production de vaccins via des plants de tabac agroinfiltrés, en conditions de culture confinée (Fischer et al., 2012 ; Rybicki, 2014).

Réalisation (organismes testés)

L'infiltration à la seringue est largement utilisée chez le tabac (*Nicotiana benthamiana*). Cette méthode offre la possibilité de pouvoir faire plusieurs infiltrations avec des gènes différents sur une même feuille, ce qui n'est pas le cas pour l'infiltration sous vide.

L'infiltration sous vide nécessite un matériel spécialisé, c'est une technique est plus robuste et mieux adaptée pour la production commerciale de protéines pharmaceutiques. Il offre également l'avantage de permettre l'agroinfiltration d'espèces végétales qui ne se prêtent pas à l'infiltration à la seringue comme la laitue et *Arabidopsis*.

Revue de référence (Chen et al., 2014).

Recherche appliquée/industrie/médicale

Intérêt des entreprises

L'agroinfiltration est utilisée pour la production de protéines recombinantes à haute valeur ajoutée. La technique permet un haut niveau d'expression du gène d'intérêt dans un temps très court (1 mois environ) en comparaison avec la transformation stable.

Remarques

Le plus souvent, les plantes agroinfiltrées ne sont menées ni à fleurs ni à graines et sont cultivées en milieu confiné. La gestion de ces plantes et des déchets issus de l'extraction des protéines d'intérêt suit les règles classiques des cultures de plantes en milieu confiné.

Bibliographie

Bhaskar, P.B., Venkateshwaran, M., Wu, L., Ané, J.M., Jiang, J. (2009). *Agrobacterium*-mediated transient gene expression and silencing : A rapid tool for functional gene assay potato. PLoS ONE. 4(6) : 1.

Chen, Q., Lai, H., Hurtado, J., Stahnke, J., Leuzinger, K., Dent, M. (2014). Agroinfiltration as an effective and scalable strategy of gene delivery for production of pharmaceutical proteins. *Adv Tech Biol Med.* ; 1(1).

Du, J., Rietman, H., Vleeshouwers, V.G.A.A. (2014). Agroinfiltration and PVX agroinfection in potato and *Nicotiana benthamiana*. *J. Vis. Exp.* (83).

Fischer, R., Schillberg, S., Hellwig, S., Twyman, R.M., Drossard, J. (2012). GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. *Biotechnol Adv.* 30(2): 434-439.

Gómez, E., Lucero, M.S., Chimeno Zoth, S., Carballeda, J.M., Gravisaco, M.J., Berinstein, A. (2013). Transient expression of VP2 in *Nicotiana benthamiana* and its use as a plant-based vaccine against infectious bursal disease virus. *Vaccine.* 31(23):2623-7.

Jia, H., Liao, M., Verbelen, J.P., Vissenberg, K. (2007). Direct creation of marker-free tobacco plants from agroinfiltrated leaf discs. *Plant cell report.* 26 (11) : 1961-1965

Leckie, B.M. and Stewart C Jr., N. (2011). Agroinfiltration as a technique for rapid assays for evaluating candidate insect resistance transgenes in plants. *Plant Cell Rep.* 30(3): 325-334.

Leuzinger, K. Dent M, Hurtado J, Stahnke J, Lai H, Zhou X, Chen Q. (2013). Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. *J. Vis. Exp* (77).

Panwar, V., McCallum, B., Bakkeren, G. (2015). A functional genomics method for assaying gene function in phytopathogenic fungi through host-induced gene silencing mediated by agroinfiltration. *Methods Mol Biol.* 1287:179-89.

Rybicki, E.P. (2014). Plant based vaccines against viruses. *Virology Journal.*(11) :205.

Von Lanken, C. and Hunt, A.G. (2015). Transient expression using agroinfiltration to study polyadenylation in plants. *Methods Mol Biol.* 1255 :127-133.

FICHE NOUVELLES TECHNIQUES

LA GREFFE VÉGÉTALE

Présentation générale de la technique (Grand public)

La greffe est utilisée couramment en arboriculture et horticulture. C'est une technique permettant de combiner les caractéristiques intéressantes de 2 espèces distinctes ou de 2 variétés d'une même espèce. Il s'agit souvent d'améliorer des caractéristiques agronomiques (résistance à des maladies, tolérance à des stress biotiques ou abiotiques, amélioration de la vigueur de la plante, de sa productivité, de son adaptation à des conditions pédoclimatiques, accélération de la mise à fruit...).

La plante obtenue consiste en un porte-greffe implanté dans le sol et d'un greffon (partie aérienne produisant tiges, feuilles, fleurs et fruits/graines). Au niveau de la greffe, des tissus vasculaires permettent les échanges entre greffon et porte-greffe.

3 cas peuvent être considérés :

- le cas d'un greffon non-génétiquement modifié (GM) greffé sur un porte-greffe GM (par exemple, l'utilisation d'un porte-greffe génétiquement modifié résistant à la maladie du court-noué).
- le cas d'un greffon GM greffé sur un porte-greffe non GM (moins courant mais possible) : les fruits et les graines issues du greffon sont transgéniques.
- le cas d'un greffon GM greffé sur un porte-greffe GM.

Principe et fonctionnement au niveau cellulaire et moléculaire

Dans le cas d'un greffon GM greffé sur un porte-greffe non GM, les tiges, feuilles, fleurs, graines et fruits seront transgéniques.

Lorsqu'un greffon non GM est greffé sur un porte-greffe GM, les cellules végétales composant les tiges, feuilles, fleurs, graines et fruits du greffon ne portent pas les modifications génétiques. Même si le porte greffe et le greffon conservent leur propre identité génétique, certaines molécules comme des peptides, protéines, facteurs de transcriptions (mRNAs, miRNAs, siRNA, issus notamment de l'expression du ou des transgènes du porte-greffe) peuvent être mobiles dans le système vasculaire de la plante de part et d'autre du point de greffe.

Par exemple, l'extinction de gène dans le porte-greffe peut être obtenu par la technique de l'ARN interférence. Dans ce cas, les siRNA utilisés peuvent circuler vers le greffon non GM et y affecter l'expression des gènes, sans modifier la nature non GM des cellules le constituant. La partie génétiquement modifiée (greffon ou porte-greffe suivant le cas) peut également l'être par le biais d'autres techniques comme l'intragenèse, la cisgenèse, les SDN (Site-directed Nucleases), la mutagenèse dirigée par oligonucléotide (voir fiches).

Modalités de mise en œuvre

La transformation génétique du porte-greffe ou du greffon peut être obtenue par les techniques traditionnelles de transgenèse, via le vecteur bactérien *Agrobacterium tumefaciens*, ou par des approches de biolistique.

Utilisations possibles

La greffe est utilisée particulièrement en arboriculture (pomme, poire, pêche, abricot, poivrier...), mais aussi en horticulture (tomate, pastèque, concombre, melon...) et en viticulture (vigne).

Avantages et contraintes par rapport aux techniques existantes

L'intérêt principal de cette technique est d'utiliser des porte-greffes GM résistants à certains champignons du sol comme *Fusarium* pour la tomate et la pastèque, ou encore *Phytophthora* pour le poivrier, et ainsi protéger ces cultures des ravages causés par ces pathogènes du sol, sans modifier génétiquement les parties consommées de la plante. Un porte-greffe unique permet la greffe puis la culture de variétés différentes.

État de l'art (non exhaustif)

Phased'avancement :

Le stade 1, correspondant à l'optimisation du gène et à la transformation de l'espèce : nombreuses études en cours.

Le stade 2, correspondant à la génération d'organismes qui sont évaluables sur le plan phénotypique : nombreuses études en cours.

Le stade 3, correspondant au stade de l'essai au champ : Vigne : Des essais en champ ont été mis en place en France, Italie, Australie.

Le stade 4, correspondant au stade de la soumission AMM, pré-marketing : la pomme « Artic » a reçu son AMM aux USA et au Canada en 2015 (greffons génétiquement modifiés pour les variétés Granny-Smith et Golden, pour ne pas brunir après épluchage, ceci par l'introduction d'un ou de plusieurs copies d'un gène de pommier (gène codant l'enzyme Polyphénol Oxydase), et l'introduction d'un transgène de résistance à la kanamycine ne s'exprimant pas dans le fruit).

Recherchefondamentale :

Beaucoup de recherches sont menées sur des arbres fruitiers, et se concentrent essentiellement sur les échanges de molécules (protéines, ARN, etc...) entre le porte-greffe et le greffon.

Réalisations (organismes testés)

Vigne, melon, pastèque, concombre, tomates, poivrier, courge, aubergine.

Revue de référence

(Haroldsen et al., 2012).

Remarques

Détection de la modification

L'aliment obtenu par la partie du greffon non GM ne contient pas de transgène. Cependant, il peut contenir des ARN ou des protéines issus de l'expression du ou des transgènes du porte-greffe.

Par les techniques de biologie moléculaire, la nature transgénique du porte-greffe est détectable, mais il n'est pas possible de détecter si les productions issues du greffon non GM se sont développées sur un porte-greffe GM ou non.

Transmission

Bien que le transport de macromolécules soit possible du porte-greffe GM au greffon non GM, il n'y a pas d'insertion de gènes dans le greffon. Le risque de dissémination du transgène est donc impossible : le pollen des fleurs du greffon n'est pas génétiquement modifié, il en est de même pour les graines.

Lorsque l'objectif est de modifier la production du greffon par l'expression d'un ARNi par le porte-greffe, le changement obtenu n'est pas héritable par les graines issues du greffon.

La reproduction végétative du porte-greffe GM ne peut être exclue mais est contrôlable.

Spécificité de la modification (effets dits « off target »)

Comme décrit précédemment, les mRNAs, les miRNAs, les siRNA sont mobiles dans le système vasculaire de la plante et aussi de part et d'autre du point de greffe (du porte greffe GM au greffon non GM). Une extinction involontaire de gène dans le greffon non GM pourrait donc survenir.

Bibliographie

Bhatt, R.M., Upreti, K.K., Divya, M.H., Bhat, S., Pavithra, C.B., Sadashiva, A.T. (2015). Interspecific grafting to enhance physiological resilience to flooding stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Scientia Horticulturae*. 182 :8-17.

Haroldsen, V.M., Szczerba MW, Aktas H, Lopez-Baltazar J, Odias MJ, Chi-Ham CL, Labavitch JM, Bennett AB, Powell AL. (2012). Mobility of Transgenic Nucleic Acids and Proteins within Grafted Rootstocks for Agricultural Improvement. *Front Plant Sci*. 3, 39.

Smolka, A., Li, X-Y., Heikelt, C., Welander, M., Zhu, L-H. (2010). Effects of transgenic rootstocks on growth and development of non-transgenic scion cultivars in apple. *Transgenic research*. 19 (6) :933-948.

FICHE NOUVELLES TECHNIQUES

CISGENÈSE / INTRAGENÈSE

Présentation générale de la technique (Grand public)

La cisgenèse correspond à un transfert de gène intact (sans modification) au sein d'une même espèce, ou entre espèces sexuellement compatibles (qui pourraient échanger des gènes par fécondation). Le gène transféré est non modifié fonctionnellement, même s'il peut contenir des variations de séquences (mutations ponctuelles) dans sa séquence codante, son promoteur, ses introns et son terminateur de transcription.

L'intragenèse correspond au transfert de séquences au sein d'une même espèce ou entre espèces sexuellement compatibles. Cependant les séquences transférées peuvent être réarrangées ou comporter différents éléments génétiques de la même plante. Elles peuvent correspondre à des séquences de gènes complètes ou partielles, ou à des éléments isolés de différents gènes d'espèces sexuellement compatibles. Par exemple, un gène régulé par un promoteur et/ou un terminateur d'un autre gène de la même espèce ou d'une espèce sexuellement compatible. L'orientation de la séquence codante du gène peut être la même que celle de l'organisme donneur ou être inversée (permettant de cette façon l'expression ou l'extinction d'un gène).

Les objectifs recherchés sont, par exemple :

- l'introduction d'allèles d'un gène (d'une autre variété ou d'une espèce voisine par exemple) conférant une résistance à une maladie alors que l'allèle de la plante cultivée ne la présente pas.
- la surexpression ou sous-expression d'un gène par changement de son promoteur.
- l'expression d'un gène anti-sens pour inhiber l'expression d'un gène.

Principe et fonctionnement au niveau cellulaire et moléculaire.

Une plante cisgénique peut comporter plusieurs cisgènes, mais ne comporte en aucun cas de séquences génétiques étrangères à la plante ou à une plante sexuellement compatible. Aucun gène marqueur n'est présent dans une plante cisgénique. Cependant dans le cas d'un transfert de gène via *Agrobacterium tumefaciens*, les bordures de l'ADN-T peuvent être intégrées dans la plante, sans que le statut de cisgène ne soit à reconsidérer.

Lorsque produites par des techniques non ciblées, la cisgenèse et l'intragenèse peuvent mener à une interruption d'ORF (Open Reading frame / cadre de lecture ouvert) existantes ou à la création de nouvelles ORF, du fait de l'insertion aléatoire du gène dans le génome de la plante.

Pour générer une plante cisgénique ou intragénique, les mêmes méthodes que celles décrites pour la transgenèse peuvent être utilisées pour transférer le gène.

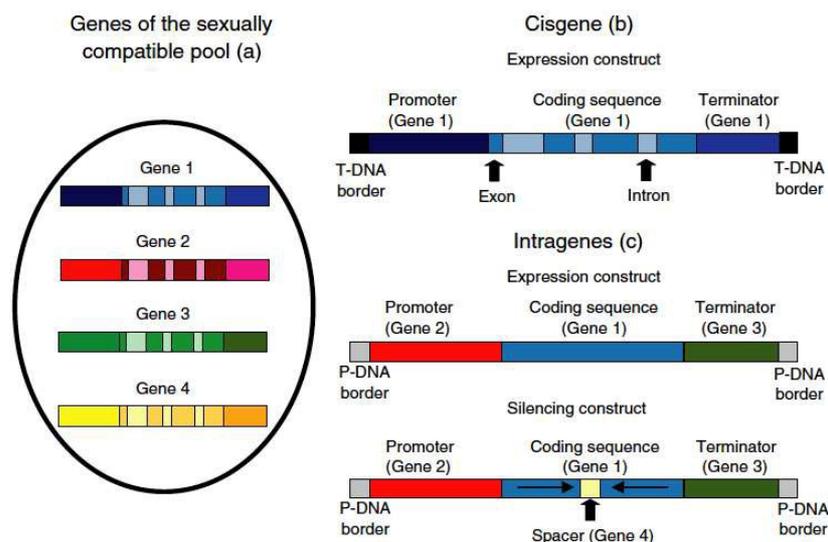


Figure 1 : Illustration des constructions génétiques utilisables pour la cisgenèse et l'intragenèse³⁶.

Le cisgène est une copie identique à un gène provenant d'un pool de gènes d'espèces sexuellement compatibles (a), incluant promoteur, introns, terminateur (b). Lorsque *Agrobacterium tumefaciens* est utilisée pour la transformation génétique, le cisgène est inséré dans le génome de la plante avec les bordures de l'ADN-T. L'intragenèse (c) permet une recombinaison *in vitro* d'éléments isolés de différents gènes d'un pool de gènes d'espèces sexuellement compatibles (a). Les introns ne sont pas forcément requis : l'ADNc ou simplement des fragments de gènes peuvent être utilisés. Des constructions permettant l'expression d'un gène ou l'extinction d'un gène peuvent être développées. D'après Rommens (2004)³⁷, l'intragène doit être inséré entre des bordures ayant le même rôle que les frontières de l'ADN-T mais isolées d'ADN d'espèces sexuellement compatibles (P-DNA), quand la transformation via *Agrobacterium tumefaciens* est utilisée.

³⁶ Holme I.B., Wendt T., Holm P.B. (2013) Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnol. J.* 11(4), 395–407.

³⁷ Rommens, C.M. (2004). All-native DNA transformation: a new approach to plant genetic engineering. *Trends in Plant Science*, 9(9), 457-464.

Modalités de mise en œuvre

Le vecteur le plus couramment utilisé pour la cisgenèse ou l'intragenèse végétale est le vecteur bactérien *Agrobacterium tumefaciens* désarmé (voir fiche Transgenèse). D'autres méthodes sont utilisées pour transférer l'ADN dans la cellule végétale, par exemple la biolistique (introduction d'ADN adsorbé sur des microbilles d'or), ou l'introduction mécanique d'ADN dans des protoplastes (cellule végétale sans paroi pectocellulosique) nécessitant l'action d'un agent chimique (par exemple le PolyEthylene Glycol (PEG), polymère qui déstabilise de façon réversible les membranes plasmiques, permettant ainsi le transfert de l'ADN au travers de la membrane) ou d'un champ électrique (électroporation).

Utilisations possibles

Des gènes de résistance à des maladies comme le mildiou ont été repérés dans des variétés sauvages de pomme de terre, de fraises ou de raisin et ont pu être introduits dans des variétés cultivées sensibles à cette maladie.

D'autres applications sont développées, comme la modification des teneurs en amylopectine (peupliers, pommes de terre) ou en phytase (orge). La surexpression d'un gène ou son inactivation par cisgenèse peut également améliorer la tolérance à la sécheresse ou des caractéristiques qualitatives (qualité boulangère du blé).

Avantages et contraintes par rapport aux techniques existantes

La cisgenèse permet d'accélérer de façon significative la création d'une nouvelle variété par rapport à l'amélioration végétale conventionnelle, en particulier pour des plantes comme la pomme de terre ou le pommier. En effet, une nouvelle variété peut être développée en 5 ans environ en utilisant la cisgenèse alors que cela peut prendre jusqu'à 25 ans ou plus par les méthodes conventionnelles d'amélioration génétique, ceci du fait de certains gènes non désirés qui sont introgressés avec le gène que l'on souhaite sélectionner et qui doivent être éliminés par rétrocroisements successifs avec la variété parentale élite.

État de l'art (non exhaustif)

Phased'avancement :

Le stade 1, correspondant à l'optimisation du gène et à la transformation de l'espèce : nombreuses études en cours.

Le stade 2, correspondant à la génération d'organismes qui sont évaluables sur le plan phénotypique : nombreuses études en cours.

Le stade 3, correspondant au stade d'essai au champ : des essais au champ ont été récemment menés en Europe : essai au champ d'orge cisgénique³⁸ au Danemark (activité augmentée de la phytase), essai au champ aux Pays-Bas de pommiers cisgéniques³⁹ (résistance au champignon *Venturia inaequalis* responsable de la tavelure).

Le stade 4, correspondant au stade de la soumission AMM, pré-marketing : pas de demande connue.

Recherche fondamentale :

Réalisation (exemples d'organismes testés)

- Pommes cis et intragénique pour la résistance à la tavelure.
- Pomme cisgénique pour éviter le brunissement après épluchage.
- Pomme de terre cisgénique pour la résistance au mildiou.
- Pomme de terre intragénique, pour un contenu diminué en acrylamide.
- Fraisier intragénique pour la résistance à la pourriture grise.
- Orge cisgénique pour une activité augmentée de la phytase (amélioration de la digestibilité pour l'alimentation animale).

Revue de référence

(Espinoza et al., 2013)

(Holme et al., 2013)

Remarques

Détection de la modification

Un cisgène ou un intragène peut être spécifiquement détecté par PCR dans les régions flanquantes du site d'insertion.

Transmission

Un cisgène ou un intragène, étant inséré dans le patrimoine génétique de la plante, est transmis à la descendance.

³⁸ Holme, I.B., Dionisio, G., Brinch-Pedersen, H., Wendt, T., Madsen, C.K., Vincze, E., Holm, P.B. (2012). A Cisgenic Approach for Improving the Bioavailability of Phosphate in the Barley Grain. ISB news report.

³⁹ Krens, F.A., Schaart JG, van der Burgh, A.M., Tinnenbroek-Capel, I.E.M., Groenwold, R., Kodde, L.P., Broggini, G.A.L., Gessler, C. and Schouten, H.J. (2015). Cisgenic apple trees; development, characterization, and performance. *Front. Plant Sci.* 6:286.

Effets non souhaités (dits « off target »)

De même que pour les techniques utilisées pour la transformation génétique, l'insertion aléatoire du cisgène ou de l'intragène peut conduire à des altérations dans le génome de la plante, comme par exemple la création de nouvelles ORF, ou des interruptions de gènes (si le cisgène ou l'intragène est introduit dans la séquence d'un gène de la plante). Ces altérations de l'expression du gène inséré par rapport à l'expression endogène dans la plante donneuse peuvent également modifier le contenu métabolique de la plante, et venir modifier l'allergénicité et/ou la toxicité de la plante.

Bibliographie

Espinoza, C., Schlechter, R., Herrera, D., Torres, E., Serrano, A., Medina, C., Arce-Johnson, P. (2013). Cisgenesis and intragenesis: new tools for improving crops. *Biol Res*, 46(4):323-31.

Holme I.B., Wendt T., Holm P.B. (2013) Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnol. J.* 11(4), 395–407.

Holme, I.B., Dionisio, G., Brinch-Pedersen, H., Wendt, T., Madsen, C.K., Vincze, E., Holm, P.B. (2012). A Cisgenic Approach for Improving the Bioavailability of Phosphate in the Barley Grain. *ISB news report*.

Krens, F.A., Schaart JG, van der Burgh, A.M., Tinnenbroek-Capel, I.E.M., Groenwold, R., Kodde, L.P., Broggin, G.A.L., Gessler, C. and Schouten, H.J. (2015). Cisgenic apple trees; development, characterization, and performance. *Front. Plant Sci.* 6:286.

Rommens, C.M. (2004). All-native DNA transformation: a new approach to plant genetic engineering. *Trends in Plant Science*, 9(9), 457-464.

FICHE NOUVELLES TECHNIQUES

SÉGRÉGANTS NÉGATIFS

Présentation générale de la technique (Grand public).

Lors de la production des gamètes, le patrimoine génétique des organismes à reproduction sexuée est « brassé », les chromosomes parentaux échantent du matériel, ce qui permet de produire des gamètes différents. De ce fait, lors du croisement mettant en œuvre un OGM il est possible d'obtenir dans la génération suivante des « individus » ne possédant pas le transgène. Ces individus sont dits « ségrégant négatifs ». Cette caractéristique peut être mise à profit pour éliminer le transgène d'une plante une fois que sa présence n'est plus requise pour le caractère recherché. Ceci permet donc d'obtenir des plantes non génétiquement modifiées, mais ayant le caractère recherché, à partir de plantes génétiquement modifiées. La technique repose sur la possibilité d'éliminer toute modification introduite par simple croisement suivi de sélections.

Principe et fonctionnement au niveau cellulaire et moléculaire.

La méiose, lors de la formation des gamètes, permet un brassage des gènes de l'individu. Dans le cas d'un individu hétérozygote pour un transgène, sa descendance sera non porteuse de transgène, dans $\frac{1}{4}$ des cas pour un croisement avec deux parents OGM porteurs du même événement de transformation et $\frac{1}{2}$ pour le cas où un seul des parents est OGM. Cependant ces individus non transgéniques auront pu bénéficier de la présence transitoire du trait conféré par le transgène.

La ségrégation négative est mise en œuvre dans le cadre de différentes techniques par exemple la SPT (seed production technique), le reverse breeding ou le flowering time reduction.

SPT(seedproductiontechnique) :

Cette technique vise à maintenir et multiplier par autofécondation une lignée de plante mâle stérile afin d'obtenir en seconde génération des plantes hybrides sans avoir recours à la castration physique de la plante. Elle s'appuie sur le maintien à l'état hétérozygote d'un gène restaurant la fertilité d'une lignée mâle stérile, lié à un gène conférant une perte de viabilité du pollen et un marqueur de transformation.

Par exemple, la technologie développée par la société Pioneer permet de multiplier par auto-fécondation des lignées de plantes mâles stériles mutées dans le gène Ms45 (ms45/ms45). La fertilité du pollen est restaurée par l'expression de l'allèle sauvage du gène Ms45 dans un transgène contenant par ailleurs le gène codant une amylase spécifique des anthères (zm-aa1) et un marqueur fluorescent (DsRed2). L'expression du gène Zm-aa1 rend le pollen incapable de germer alors que le gène de fluorescence exprimé dans les graines permet d'identifier les graines porteuses du transgène. Cette lignée hétérozygote pour le transgène est appelée « GM maintenir ». La lignée peut ainsi être amplifiée par autofécondation en sélectionnant les graines colorées en rouges par l'expression du transgène DsRed2. Dans la descendance de cette lignée, les graines jaunes seront de génotype ms45/ms45 non transgéniques et mâles stériles.

Afin de générer des plantes mâles stériles en quantité suffisante pour la production d'hybrides, les lignées mâles stériles ms45/ms45 sont semées à proximité de GM maintenir. Alors que le pollen transgénique des plantes GM maintenir ne pourra germer du fait de l'expression du transgène zm-aa1, seuls les grains de pollen non transgéniques polliniseront les plantes ms45/ms45 et permettront d'amplifier la lignée. Ce croisement spécifique pourra être vérifié par l'absence de coloration des grains de maïs (Cigan et al., 2014)(Unger et al., 2002).

Reversebreeding :

Cette technique a pour objectif d'obtenir, à partir d'une plante hybride d'intérêt, deux plantes qui une fois croisées donneront la plante hybride souhaitée. Elle s'appuie sur une inhibition de la recombinaison méiotique par l'inactivation d'un gène (Par exemple : DSMC1, gène impliqué, chez les plantes, dans les crossing-over lors de la méiose). Cette inactivation peut être réalisée par une approche ARN interférent ou d'autres techniques. L'absence de recombinaison conduit à la génération de gamètes mâles et femelles dont les chromosomes parentaux restent « identiques ». A partir de chacun de ces gamètes, il est alors possible, in vitro, chez les plantes permissives, de générer des plantes haploïdes doubles homozygotes (DHs). Par sélection de ces plantes, il est par la suite possible d'identifier 2 parents potentiels qui permettront de produire des plantes hybrides identiques, non transgéniques (Wijnker et al., 2014)(Wijnker et al., 2012).

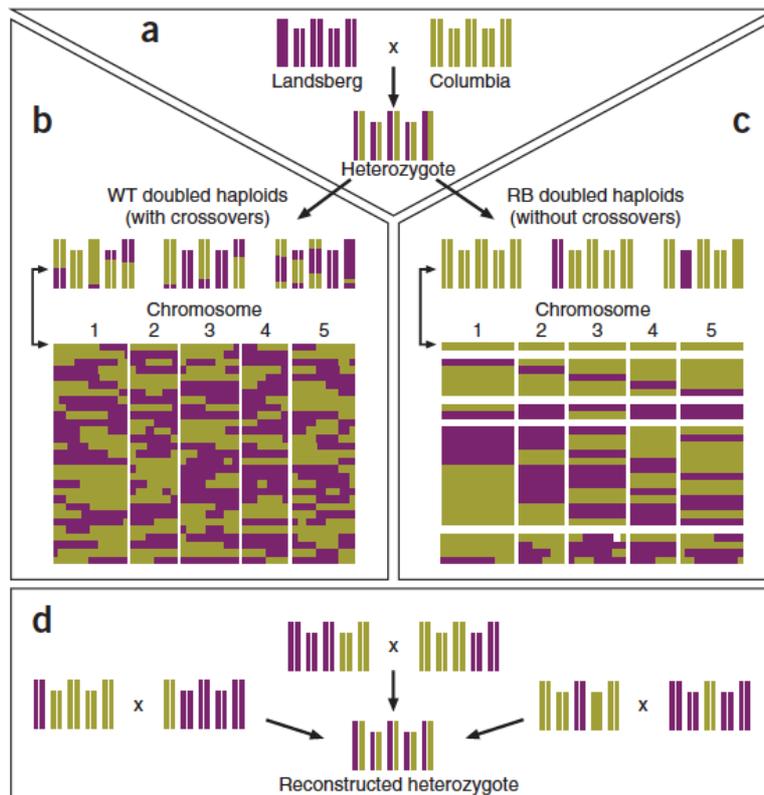


Figure 1 : Stratégie du reverse breeding, génotypes du descendant sauvage (WT) et du descendant double haploïde. (Wijnker et al., 2012) (a) Le reverse breeding commence avec une plante hétérozygote dans laquelle la recombinaison méiotique peut être supprimée. (b) Génotype de 29 plantes sauvages doubles haploïdes sélectionnées au hasard. 3 individus sont représentés de manière verticale, les autres sont représentés par des lignes horizontales. Chaque ligne représente les chromosomes 1 à 5 pour une plante individuelle. Des chromosomes non recombinants sont présentés. (c) 21 génotypes sans crossing-over obtenus de 36 plantes double-haploïdes suite au reverse breeding. La première ligne présente un génotype identique à celui d'un des parents d'origine. Les autres lignes présentent des génotypes avec substitution d'un ou plusieurs chromosomes. Les quatre dernières lignes sont des descendants haploïdes qui ont tout de même réalisés des crossing-overs. (d) Trois paires de double-haploïdes obtenus par reverse breeding ont été croisées pour obtenir l'hybride original.

Floweringtimereduction:

Cette technique a pour objectif de réduire le temps entre 2 générations de plantes afin de rendre la sélection classique par croisements plus courte.

Modalités de mise en œuvre

Toutes les techniques de transfert génétique peuvent être utilisées pour obtenir des ségréants négatifs. Les virus non intégratifs et sans transmission verticale sont parfaitement adaptés.

Utilisations possibles

L'utilisation des ségréants négatifs peut permettre :

- la réduction du temps entre 2 générations en jouant sur le temps de floraison des arbres fruitiers (Yamagishi et al., 2014) ou d'ornement
- la facilitation des croisements en utilisant des gènes de stérilité mâle (Pioneer seed production technology SPT)
- le reverse breeding
- toute utilisation nécessitant de faire bénéficier les plantes parentales d'un trait non transmis à la descendance.

Avantages et contraintes par rapport aux techniques existantes

Cette approche met en œuvre des techniques existantes et permet d'obtenir des plantes non transgéniques ayant bénéficié de traits conférés par leurs parents génétiquement modifiés ou d'une sélection plus simple.

État de l'art (non exhaustif)

Phased'avancement :

Le stade 1, correspondant à l'optimisation du ciblage du gène et à la transformation de l'espèce, est en cours pour jouer sur le temps de floraison du pommier (Yamagishi et al., 2014) et sur le reverse breeding sur *Arabidopsis thaliana* (preuve de concept) (Wijnker et al., 2012).

Le stade 2, correspondant à la génération d'organismes évaluables sur le plan phénotypique : pas de données connues.

Le stade 3, correspondant au stade de l'essai au champ : pas d'essais connus.

Le stade 4, correspondant au stade de la soumission AMM, pré-marketing : le système SPT de Pioneer permettant de maintenir une lignée mâle stérile pour la génération de plantes hybrides non GM. (<https://www.pioneer.com>).

Recherche fondamentale :

Réalisation (organismes testés)

Cette « technique » peut être appliquée à tous les organismes à reproduction sexuée (animaux, végétaux ou micro-organismes)

Le SPT développé par Pioneer a été appliqué au maïs mais serait utilisable chez beaucoup d'autres plantes.

La réduction de temps de génération a été mise en évidence chez le pommier mais pourrait être appliquée à d'autres arbres fruitiers ou ornementaux.

Le reverse breeding reste réservé à des plantes modèles pour le moment car l'étape de génération des plantes haploïdes doublées homozygotes (DHs) est limitante.

Revue de référence

Reverse breeding : (Dirks et al., 2009)(De Storme and Geelen, 2013)

SPT : site de Pioneer (<https://www.pioneer.com>)

Flowering time reduction : pas de revue, un article unique (Yamagishi et al., 2014)

Recherche appliquée/industrie/médicale

Remarques

Détection de la modification introduite.

L'utilisation des ségréants négatifs est non détectable puisqu'il n'y a aucune trace. La seule traçabilité papier peut rendre compte de l'utilisation de cette technique.

Transmission

La technique est basée sur la non transmission du caractère.

Spécificité de la modification (Effets dits «Off target»)

Ceci est dépendant de la technique utilisée mais une vérification de l'absence de transgène est nécessaire et devrait permettre d'éliminer toutes les plantes encore transformées

Bibliografie

Cigan, A.M., Haug-Collet, K., and Clapp, J. (2014). Transcriptional silencing of heterologous anther promoters in maize: a genetic method to replace detasseling for seed production. *Plant Reprod.* 27, 109–120.

Dirks, R., van Dun, K., de Snoo, C.B., van den Berg, M., Lelivelt, C.L.C., Voermans, W., Woudenberg, L., de Wit, J.P.C., Reinink, K., Schut, J.W., et al., (2009). Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis. *Plant Biotechnol. J.* 7, 837–845.

De Storme, N., and Geelen, D. (2013). Sexual polyploidization in plants--cytological mechanisms and molecular regulation. *New Phytol.* 198, 670–684.

Unger, E., Cigan, A.M., Trimnell, M., Xu, R., Kendall, T., Roth, B., and Albertsen, M. (2002). A chimeric ecdysone receptor facilitates methoxyfenozide-dependent restoration of male fertility in ms45 maize. *Transgenic Res.* 11, 455–465.

Wijnker, E., van Dun, K., de Snoo, C.B., Lelivelt, C.L.C., Keurentjes, J.J.B., Naharudin, N.S., Ravi, M., Chan, S.W.L., de Jong, H., and Dirks, R. (2012). Reverse breeding in *Arabidopsis thaliana* generates homozygous parental lines from a heterozygous plant. *Nat. Genet.* 44, 467-470.

Wijnker, E., Deurhof, L., van de Belt, J., de Snoo, C.B., Blankestijn, H., Becker, F., Ravi, M., Chan, S.W.L., van Dun, K., Lelivelt, C.L.C., et al., (2014). Hybrid recreation by reverse breeding in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Protoc.* 9, 761–772.

Yamagishi, N., Sasaki, S., Yamagata, K., Komori, S., Nagase, M., Wada, M., Yamamoto, T., and Yoshikawa, N. (2011). Promotion of flowering and reduction of a generation time in apple seedlings by ectopical expression of the *Arabidopsis thaliana* FT gene using the Apple latent spherical virus vector. *Plant Mol. Biol.* 75, 193–204.

Yamagishi, N., Kishigami, R., and Yoshikawa, N. (2014). Reduced generation time of apple seedlings to within a year by means of a plant virus vector: a new plant-breeding technique with no transmission of genetic modification to the next generation. *Plant Biotechnol. J.* 12,60-6