
HAUT CONSEIL DES BIOTECHNOLOGIES

« NOUVELLES TECHNIQUES » - « NEW PLANT BREEDING TECHNIQUES »

Première étape de la réflexion du HCB - Introduction générale

Paris, le 20 janvier 2016

Sur proposition de son Bureau, le **Haut Conseil des biotechnologies s'est saisi de la question des nouvelles techniques d'obtention de plantes, dites « New Plant Breeding Techniques » (NPBT)**. Ces NPBT, qui ont déjà conduit pour certaines au développement et à la mise sur le marché de variétés végétales en Amérique du Nord, suscitent en effet une série de questions aujourd'hui débattues, liées aux opportunités et aux risques qu'elles pourraient présenter, ainsi qu'à la manière dont elles devraient être réglementées.

Le HCB procède ici à une première étape de la réflexion sur les NPBT¹, en procédant à la clarification des termes du débat et à l'expertise de certaines des questions en jeu. Il s'est focalisé, dans cette **première étape de son travail**, sur les points suivants :

- la description des principales NPBT soumises à étude à ce jour par la Commission européenne ;
- les enjeux qui y sont liés : opportunités potentielles, notamment en termes de développement de variétés présentant des caractéristiques nouvelles qui ne pourraient pas être obtenues par les techniques de sélection déjà disponibles (sélection classique, transgénèse) ; risques qu'elles pourraient éventuellement présenter, au plan sanitaire ou environnemental, mais aussi aux plans socio-économique et éthique ;

¹ Voir les relevés des décisions des Bureaux des 5 novembre, 1er décembre et 15 décembre 2015. On notera que ce travail s'est déroulé dans une relative urgence étant donné les annonces faites par la Commission européenne quant à l'agenda de sa réflexion sur l'encadrement des NPBT, et que les membres du HCB ont été amenés dans des délais très brefs à prendre connaissance de textes nombreux et denses sur un sujet complexe.

- la question de savoir si et comment il conviendrait, au regard de ces éléments, d'encadrer le développement des NPBT et la commercialisation de leurs produits.

Pour aborder ces questions, le HCB a mobilisé les compétences de son Comité scientifique (CS) et de son Comité économique, éthique et social (CEES), selon les modalités suivantes définies par le Bureau.

Pour le CS : le Bureau a demandé au CS d'aborder deux questions : la description des NPBT, en se focalisant dans un premier temps sur les 8 techniques ainsi qualifiées dans les discussions européennes² ; les éventuels risques des NPBT pour l'environnement et la santé, ainsi que les éléments susceptibles de servir la réflexion quant à la qualification « OGM » ou non des produits des NPBT.

Un Groupe de travail³ a décrit ces techniques et identifié les questions qu'elles soulèvent. Une note rédigée à partir de ces documents a ensuite été discutée et validée en séance plénière du comité⁴.

Pour le CEES : les représentants des organisations et personnalités qualifiées membres du CEES ont été invitées à produire des contributions synthétiques destinées à clarifier leur positionnement ; ces contributions ainsi qu'un résumé de nombreuses analyses juridiques des NPBT ont été versées aux débats du CEES et discutées en séance plénière du comité⁵. Suite à ce débat, d'autres membres du CEES ont fait connaître ou explicité leur positionnement. Une note synthétisant l'ensemble de ces contributions et les débats auxquels elles ont donné lieu au CEES a été revue et validée par les membres du comité.

A l'issue de cette première étape, on trouvera donc ci-dessous les éléments suivants.

1. Pour ce qui concerne les travaux produits par le Comité scientifique :

- une note introduisant la question des NPBT ainsi que les interrogations qu'elles soulèvent au plan scientifique (« CS – Note sur les « Nouvelles Techniques » (Document 1) ;
- en annexe de cette note, une série de fiches descriptives de chaque technique.

2. Pour ce qui concerne les travaux produits par le Comité économique, éthique et social :

- Les contributions de membres du CEES :

² Voir la liste des techniques dans les documents du CS qui suivent. Dans le deuxième volet de sa réflexion, le CS sera invité à considérer d'autres techniques éventuellement pertinentes, exploitant notamment les mécanismes épigénétiques, et qui pourraient à l'avenir être utilisées pour l'obtention de plantes.

³ Groupe mis en place en fin de 1^{er} mandat du HCB. Composition détaillée dans la note du CS.

⁴ Séance du CS du 16 décembre 2015.

⁵ Séances du CEES des 10 novembre et 16 décembre 2015.

.Contribution collective proposée par les organisations Coop de France, FNSEA, Groupement National Interprofessionnel des Semences, Jeunes Agriculteurs, Union Française des Semenciers (ci-après CdF, FNSEA, GNIS, JA, UFS) (Annexe 1).

. Contribution collective proposée par les organisations Les Amis de la terre, Confédération Paysanne, Fédération Nationale d'Agriculture Biologique, France - Nature - Environnement, Greenpeace, Réseau Semences Paysannes et Union Nationale des Apiculteurs de France (ci-après AdT, CP, FNAB, FNE, GP, RSP et UNAF) (Annexe 2). Cette contribution, ensuite enrichie d'éléments apportés par D. Evain (FNAB) et B. Bonzi (Les Amis de la Terre), se divise en 5 parties (Annexes 2.1 à 2.5).

.Contribution de la Fédération du Commerce et de la Distribution (FCD) (Annexe 3).

.Contribution du Conseil National des Associations Familiales laïques (CNAFAL) (Annexe 4).

.Contribution de Sarah. Vanuxem, personnalité qualifiée en droit (Annexe 5).

.Contribution d'Estelle. Brosset, personnalité qualifiée en droit (Annexe 6).

D'autres organisations et personnalités qualifiées ont soumis au Secrétariat du HCB des éléments d'information et de positionnement ne prenant pas la forme d'un texte rédigé *in extenso* (et intégrés dans la Note synthétique citée *infra*) : Serge Boarini (personnalité qualifiée en sociologie) ; Sophie Fonquernie (Association des Régions de France) ; François Lucas (Coordination Rurale) ; René Mazars (Collectif Interassociatif Sur la Santé).

- Pour compléter cet ensemble, est proposé un « Résumé des principales analyses juridiques disponibles relatives à l'applicabilité de la directive 2001/18/CE aux NPBT » (Annexe 7).

- On trouvera enfin un document de synthèse établi à partir de tous ces éléments et des débats auxquels ils ont donné lieu au CEES (CEES - « Synthèse des contributions et des débats ») (Document 2).

Comme décidé par le Bureau du HCB et étant donné le temps contraint dans lequel cette première étape du travail s'est déroulée, le HCB engage dès à présent une deuxième étape destinée à approfondir une série points dont les suivants : traçabilité des NPBT, information des consommateurs, protection juridique des techniques et des produits, réglementation, examen prospectif des techniques, analyse de la maturité de celles qui sont effectivement mises en œuvres, etc. afin de fournir aux autorités publiques l'ensemble des éléments d'appréciation nécessaires⁶.

L'ensemble de ces points fera l'objet de développements dans la deuxième partie des travaux du HCB.

Christine Noiville, Présidente du Haut Conseil des biotechnologies

⁶ Une demande d'un membre du CS a été expressément formulée sur certains de ces points ; ces derniers seront mis en débat dès les prochaines séances du CS.

HIGH COUNCIL FOR BIOTECHNOLOGY

NEW PLANT BREEDING TECHNIQUES

General introduction: First stage of HCB deliberations

Paris, 20 January 2016

At the suggestion of its Board, **the High Council for Biotechnology decided to address the issue of new plant breeding techniques (NPBTs) through a self-referral.** These NPBTs, some of which have already led to development and market release of new plant varieties in North America, raise a number of questions, currently being debated, concerning their risks and opportunities and the manner in which they should be regulated.

HCB has begun the first stage of its deliberations concerning NPBTs¹ by clarifying the terms of the debate and assessing some of the issues involved. It has focused, in this **first stage of its work**, on the following points:

- Description of the main NPBTs currently being examined by the European Commission;
- Related issues: potential opportunities, particularly for development of varieties with new traits that cannot be obtained using the breeding techniques already available (conventional breeding, transgenesis); possible risks to health and the environment as well as in the socio-economic and ethical fields;

¹ See statements of decisions of the Board meetings of 5 November, 1 December and 15 December 2015. It should be noted that this work had to be done in relatively short order, given the announcements by the European Commission on the discussion timetable for NPBT regulation, and members of HCB had to study a large volume of technical literature on a complex subject in a very short space of time.

- The question of whether or how, in the light of these aspects, development of NPBTs and marketing of their products should be regulated.

To deal with these issues, HCB enlisted the expertise of its Scientific Committee (SC) and Economic, Ethical and Social Committee (EESC) on the following basis, decided by the Board.

SC: The Board asked the Scientific Committee to address two questions: a description of NPBTs, concentrating initially on the eight techniques being discussed by the European Commission², and the possible risks of NPBTs to health and the environment, together with information likely to be of use when deciding whether or not to classify NPBT products as GMOs. A working group³ described these techniques and identified the questions they raised. A memorandum drafted on the basis of this material was then discussed and approved at a full meeting of the committee⁴.

EESC: Qualified individuals and representatives of organisations belonging to the EESC were invited to provide summary papers clarifying their positions; these papers, together with a summary of the many legal analyses of NPBTs, contributed to the debate within the EESC and were discussed at a full meeting of the committee⁵. Further to this discussion, other EESC members made known or explained their positions. A briefing paper summarising all these contributions and the discussions to which they had given rise in the EESC was reviewed and approved by committee members.

This first stage thus produced the following material.

1. Work by the Scientific Committee

- A memorandum introducing the issue of NPBTs and the scientific questions that they raise (Scientific Committee, *Memorandum on New Plant Breeding Techniques* (Document 1));
- A set of fact sheets (one for each technique) as an appendix to this memorandum.

2. Work by the Economic, Ethical and Social Committee

- Papers from EESC members:

² See list of NPBTs in following Scientific Committee documents. During the second stage of its deliberations, the Scientific Committee will be invited to consider other potentially relevant techniques, such as those involving epigenetic mechanisms, that might be used to produce plants in future.

³ Group set up at the end of HCB's first term. Details of its composition are given in the Scientific Committee memorandum.

⁴ Scientific Committee meeting of 16 December 2015.

⁵ EESC meetings of 10 November and 16 December 2015.

. Joint paper by the Coop de France farming cooperatives' association (CdF), the FNSEA farmers' union, the National Seed Association (GNIS), the Young Farmers (JA) and the French Union of Seed companies (UFS): Appendix 1.

. Joint paper by Friends of the Earth France (AdT), the Confédération Paysanne farmers' union (CP), the Organic Farming Federation (FNAB), France Nature Environnement (FNE), Greenpeace (GP), the Farm Seed Network (RSP) and the French Beekeepers' Association (UNAF): Appendix 2. This paper, which was subsequently supplemented with information from D. Evain (FNAB) and B. Bonzi (Friends of the Earth France), is divided into five parts (Appendices 2.1 to 2.5).

. Paper by the Trade and Retail Federation (FCD): Appendix 3.

. Paper by the National Council of Secular Family Associations (CNAFAL): Appendix 4.

. Paper by Sarah Vanuxem, qualified individual in the field of law: Appendix 5.

. Paper by Estelle Brosset, qualified individual in the field of law: Appendix 6.

Other organisations and qualified individuals have provided the HCB secretariat with information and points of view in different forms (included in the briefing paper mentioned below): Serge Boarini (qualified individual in the field of sociology), Sophie Fonquernie (Association of French Regions), François Lucas (Coordination Rurale farmers' union) and René Mazars (Collectif Interassociatif Sur la Santé, a health umbrella group).

- Rounding off this set of documents is a 'Summary of the main legal analyses of applicability of Directive 2001/18/EC to NPBTs': Appendix 7.

- Lastly comes a briefing paper based on all the above information and the discussions to which it gave rise in the EESC (EESC, Overview of papers and discussions (Document 2)).

As decided by the HCB Board, and given the short time-frame for this first stage of work, HCB is now embarking on the second stage to examine a number of points in greater detail – NPBT traceability, consumer information, legal protection of techniques and products, regulation, forward-looking review of techniques, maturity analysis of techniques actually used, etc. – in order to provide the public authorities with all the information they require to form an opinion⁶. All these points will be developed further in the second stage of HCB work.

Christine Noiville, President of the High Council for Biotechnology

⁶ One member of the Scientific Committee made a specific request regarding some of these points – points that will be discussed at the next Scientific Committee meetings.

COMITÉ SCIENTIFIQUE

NOTE SUR LES

« NOUVELLES TECHNIQUES »

Paris, le 19 janvier 2016

Le HCB s'est auto-saisi de la question dite des « nouvelles techniques ». Le Comité scientifique (CS)¹ du HCB a mobilisé un groupe de travail (GT)² spécifiquement constitué pour étudier une série de techniques et leurs éventuels impacts environnementaux, sanitaires et technologiques.

Le travail se présente en deux parties :

- la première introduit la question et les interrogations qui sous-tendent le débat de la réglementation de ces techniques.
- la seconde est constituée d'une série de fiches descriptives de chaque technique réalisée par le GT (Annexe 1).

¹ La composition du CS est indiquée dans l'Annexe 2.

² La composition du GT est indiquée dans l'Annexe 2.

Table des matières

1. Introduction – mise en contexte et clarification des termes.....	3
2. Caractérisation générale des NPBT.....	5
3. Questions soulevées par les NPBT.....	6
4. Conclusions / synthèse	14
ANNEXE 1 : FICHES DESCRIPTIVES DES « NOUVELLES TECHNIQUES ».....	17
ZINC FINGER NUCLEASE	19
TALE-NUCLEASE (TALEN).....	29
CRISPR-CAS9 ET NUCLÉASES GUIDÉES PAR ARN.....	37
MUTAGENÈSE DIRIGÉE PAR OLIGONUCLÉOTIDES	49
MODULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES PAR RdDM.....	55
AGROINFILTRATION	59
LA GREFFE VÉGÉTALE	65
CISGENÈSE / INTRAGENÈSE	69
SÉGRÉGANTS NÉGATIFS	75
TRANSGENÈSE VÉGÉTALE	81
ANNEXE 2 : Elaboration de la note	85
ANNEXE 3 : Traduction anglaise de la note	87

1. Introduction – mise en contexte et clarification des termes

L'essor de nouvelles biotechnologies végétales avec la conception et la mise en œuvre de nouvelles méthodes d'amélioration des plantes pose un certain nombre de questions. La question des « NPBT » (*New Plant Breeding Techniques*, nouvelles techniques d'amélioration des plantes) débattue aujourd'hui en Europe, a été soulevée dans le cadre d'une interrogation sur l'encadrement réglementaire des produits issus de la mise en œuvre de procédés nouveaux d'amélioration génétique pour lesquels il existe un flou quant à leur inclusion dans le champ d'application des directives relatives à l'utilisation des OGM³. La résolution de cette question est importante voire déterminante pour l'adoption de ces techniques par les sélectionneurs, à l'origine de cette interrogation. Il est par ailleurs important de clarifier les termes de la question pour l'information de l'ensemble des acteurs, incluant les filières et les consommateurs.

Notons que du fait de l'historique de la question⁴, la liste des techniques discutée est relativement hétéroclite⁵, et leur appellation « *New Plant Breeding Techniques* » peut prêter à confusion. Ainsi :

- (1) si elles s'appliquent toutes à l'amélioration des plantes, les techniques considérées ne sont pas nécessairement spécifiques du domaine du végétal : par exemple, l'application des techniques exploitant des nucléases dirigées (SDN pour *site-directed nucleases*, ou techniques d'édition des génomes) est également très développée dans le monde animal ;
- (2) de plus, des techniques d'amélioration des plantes qui pourraient être considérées nouvelles ou qui vont aider à produire des plantes que l'on peut obtenir par l'une des NPBT ne figurent pas dans la liste lorsqu'elles ne soulèvent pas de question relative à la réglementation OGM : ainsi, la sélection génomique, en plein essor en amélioration des plantes, n'est pas considérée ;
- (3) par ailleurs, ces techniques ne sont pas nécessairement nouvelles : par exemple, la technique de la greffe n'est pas nouvelle, mais la question du statut, génétiquement modifié (GM) ou non, des produits issus d'une greffe d'un scion non-GM sur un porte-greffe GM, se pose ;
- (4) enfin, certains items de la liste ne sont pas des techniques *per se* mais correspondent à des utilisations de techniques de modification génétique : par exemple, des stratégies innovantes d'amélioration des plantes. Leur statut pose alors la question réglementaire mentionnée plus haut (cas des ségréants négatifs par exemple) ;
- (5) un dernier niveau de complexité s'ajoute du fait de la possibilité de multiples combinaisons entre les dites techniques : par exemple, la cisgène ciblée à l'aide de SDN3 (voir tableau n°2, page 14).

³ Les directives européennes relatives à l'utilisation des OGM sont (1) la directive 2001/18/CE relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement, et (2) la directive 2009/41/CE relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés.

⁴ Rapport initial du COGEM en 2006 suivi de la mise en place d'un groupe de travail à la Commission européenne et de la publication dans un journal à haut facteur d'impact (*Nature Biotechnology*) des résultats de la réflexion parallèle du Centre Commun de Recherche de la Commission (Lusser *et al.*, 2012).

⁵ Liste de techniques discutées par le groupe de travail de la Commission européenne : *Oligonucleotide Directed Mutagenesis (ODM)*, *Zinc Finger Nuclease Technology (ZFN)*, *Cisgenesis (comprising Cisgenesis and Intragenesis)*, *Grafting*, *Agro-infiltration*, *RNA-dependent DNA methylation (RdDM)*, *Reverse Breeding*, *Synthetic Genomics*.

Anticipant une saisine du HCB par les autorités compétentes françaises en perspective d'une consultation des Etats membres par la Commission européenne, le Comité scientifique a constitué un groupe de travail pour :

- (1) décrire les techniques de manière concise, accessible et pédagogique, avec des informations sur leurs applications potentielles, l'état de l'art, leur stade de développement et d'adoption au travers d'entretiens avec des acteurs (Annexe 1),
- (2) identifier les questions qu'elles soulèvent.

Sur la base des techniques en discussion à la Commission européenne, les techniques considérées dans ce rapport sont les suivantes⁶ :

1. Nouvelles techniques de modifications ciblées du génome
 - i. Nucléases dirigées (**SDN**⁷ : **ZFN**⁸, **MN**⁹, **TALEN**¹⁰, **CRISPR**¹¹/**Cas**)
 - ii. **Mutagenèse dirigée par oligonucléotides** (**ODM**¹², **RTDS**¹³, ...)
2. Techniques exploitant les mécanismes épigénétiques
 - i. **Modulation de l'expression des gènes par RdDM**¹⁴ (Dans une seconde étape de la réflexion, le CS pourra considérer également d'autres techniques exploitant les mécanismes épigénétiques et qui pourraient à l'avenir être utilisées en amélioration des plantes.)
3. Considération d'éléments annexes à l'utilisation de techniques de modification génétique quelles qu'elles soient
 - i. Contextes particuliers d'utilisation de techniques de modification génétique
 - **Agroinfiltration**
 - **Greffe** d'un scion non-GM sur un porte-greffe GM ou d'un scion GM sur un porte-greffe non-GM
 - ii. Nouveaux concepts associés à la nature de la séquence modifiée
 - **Cisgenèse / Intragenèse**
 - iii. Considération de la descendance d'individus modifiés desquels la modification génétique a été éliminée par ségrégation
 - **Ségrégants négatifs**, produits dans le cadre de stratégies de sélection innovantes (*ex : Reverse breeding, diverses méthodes d'accélérée breeding, Seed Production Technology...*)

⁶ Les éléments faisant l'objet d'une fiche spécifique sont signalés en gras. Une fiche supplémentaire est dédiée à la transgenèse « classique » pour comparaison.

⁷ SDN : Site-Directed Nucleases

⁸ ZFN : Zinc Finger Nuclease

⁹ Les méganucleases (MN) n'ont pas fait l'objet d'une fiche car le groupe de travail a estimé que la technique était déjà dépassée par les autres outils de modification ciblée.

¹⁰ TALEN : Transcription activator-like effector nuclease

¹¹ CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

¹² ODM : Oligonucleotide Directed Mutagenesis

¹³ RTDS : Rapid Trait Development System

¹⁴ RdDM : RNA-dependent DNA methylation.

2. Caractérisation générale des NPBT

Par rapport à la transgénèse « classique », le ciblage moléculaire des modifications génétiques dans le génome est le progrès le plus significatif apporté par certaines des nouvelles techniques.

Le ciblage peut être obtenu par le biais de nucléases dirigées vers une séquence choisie de l'ADN (**SDN** : ZFN, MN, TALEN et CRISPR/CAS9 (voir Annexe 1)). L'utilisation de ce ciblage peut être adaptée à trois objectifs différents : (1) un objectif de mutation (insertion ou délétion) ponctuelle ou concernant un petit nombre de nucléotides, voire quelques dizaines, de nature aléatoire **tout en étant ciblée** vers un site particulier du génome, **dit SDN1** ; (2) un objectif de **conversion allélique**, consistant à modifier la séquence d'un gène donné sur toute ou partie de sa séquence, **dit SDN2** ; et (3) un objectif d'intégration ciblée d'une séquence d'ADN, **dit SDN3**.

Le schéma ci-dessous permet d'inscrire certaines techniques dans le paysage actuel (Figure 1) :

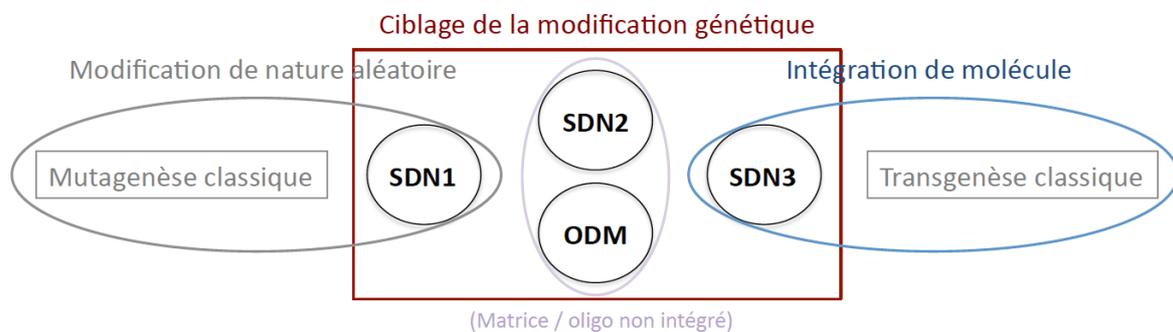


Figure 1. Les nouvelles techniques d'amélioration des plantes : L'application SDN1 se distingue de la mutagenèse classique en ce qu'elle est ciblée en un site donné ; elle conduit le plus souvent, mais pas exclusivement, à la perte de fonction d'un gène donné. A cette fin, les nucléases dirigées sont introduites dans la cellule pour cibler un site de mutation, sans en prédéfinir la nature. Dans l'application SDN2, l'introduction dans la cellule d'une matrice d'ADN, en plus des nucléases dirigées, permet de définir précisément la nature de la modification induite. La matrice n'est pas intégrée au génome. Le même objectif peut être réalisé par la technique de mutagenèse dirigée par oligonucléotides (ex : ODM, RTDS). L'application de la technique SDN3 permet l'intégration ciblée d'une séquence. C'est ce ciblage du site d'insertion du transgène qui distingue cette technique de la transgénèse classique.

La technique de RdDM (**RNA-dependent DNA methylation**), exploite des mécanismes épigénétiques¹⁵ permettant la modulation de l'expression d'un gène donné sans en modifier la séquence nucléotidique. Appliquée à une plante, cette technique vise à modifier l'expression (l'augmenter ou la diminuer) d'un gène endogène à la plante. Il peut en résulter des modulations d'activités métaboliques par exemple. Il est aussi possible de moduler l'expression d'un gène d'un organisme interagissant avec une plante, ceci permettant de cibler un pathogène par exemple. **Le point important à considérer est le ciblage qui précise la localisation de la modification épigénétique envisagée.** Cet objectif peut être atteint par le biais de l'expression d'une molécule et pas nécessairement d'un transgène ou par une expression transitoire de transgène ou de protéines ciblées (ex : par agroinfiltration, système CRISPR avec une protéine de fusion ayant une activité de méthyltransférase (CAS9-MT) ou par modification induite par une infection virale transitoire (VIGS)).

¹⁵ L'épigénétique définit les mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de l'expression d'un caractère codé génétiquement. Dans le contexte de ce document, ce sont les modifications par méthylation de l'ADN qui sont concernées. Ces modifications de l'ADN sont réversibles et si elles sont transmissibles d'une génération à l'autre, les conditions du maintien dépendent de l'environnement. D'autres modifications sont possibles sur les protéines qui sont associées à l'ADN.

Dans ces cas de transfert transitoire¹⁶, la modification épigénétique de modulation d'expression d'un gène pourrait être transmise sur quelques générations.

Les autres techniques considérées dans la liste de la page 4 concernent des méthodes annexes à l'utilisation des techniques précédentes, sans exclure la transgénèse « classique ». Il s'agit alors soit du contexte de leur utilisation (agroinfiltration, greffe), de la nature du gène modifié (cisgénèse/intragenèse), ou de leur utilisation dans le cadre de stratégies de sélection innovantes conduisant à une élimination de matériel génétique par ségrégation au travers de croisements classiques (ségréchants négatifs).

3. Questions soulevées par les NPBT

Considérant le cadre actuel de la réglementation européenne sur les OGM, les interrogations relatives au statut réglementaire des techniques mentionnées s'intéressent notamment à leur similarité avec des techniques prises en compte par les directives actuelles (principalement la directive 2001/18/CE). Il est en particulier attendu de pouvoir statuer sur le fait de savoir si ces techniques sont considérées comme générant un OGM ou non, selon la définition juridique associée, et si elles doivent être réglementées en tant que telles, ou si elles seraient exemptées d'évaluation.

Ainsi, sur la base des textes actuellement en vigueur, le statut OGM d'un produit lui est conféré lorsqu'il est obtenu par des techniques impliquant notamment une **insertion de nouvelle molécule d'ADN recombinant**. Les textes incluent les produits issus de techniques impliquant une modification pouvant s'assimiler à une **mutation**. Il est rappelé que les produits de mutagenèse sont exemptés d'évaluation en raison d'un historique d'utilisation qui n'a pas révélé de risque spécifique.

Par ailleurs, la capacité de **ciblage** des modifications dans le génome, offerte par certaines des techniques, est mise en avant pour éventuellement justifier un allègement réglementaire en matière d'exigences d'évaluation.

La question de la **transmission** et de l'**héritabilité** de la modification est également importante à considérer concernant l'encadrement réglementaire des produits issus de ces techniques. Elle concerne deux niveaux de réflexion : (1) la présence transitoire (ou non transmise) *versus* héritable de la modification génétique elle-même (modification de cellules somatiques *vs* germinales, sachant qu'une modification de cellules somatiques peut également se transmettre par propagation végétative) et (2) la présence transitoire *versus* héritable de conséquences épigénétiques d'une modification génétique (des modifications épigénétiques peuvent être induites sans nécessiter d'insertion stable de matériel génétique dans le génome ; dans le cas d'une insertion stable, elles peuvent perdurer après son élimination par ségrégation).

- Une approche également possible serait de considérer les produits (fruits, graines, fourrage...) s'ils ne contiennent pas de transgène. Ainsi, les produits seraient étudiés indépendamment d'autres parties de la plante qui ne rentreraient pas dans une filière de commercialisation. Ceci ne veut pas dire que cette dernière partie ne ferait pas l'objet d'une évaluation, en particulier si ses caractéristiques génétiques étaient couvertes par la directive 2001/18/CE, mais le produit, en ce qu'il ne serait pas distinguable d'un produit similaire obtenu par une technique ne relevant pas du champ de la définition des OGM, ne devrait pas être soumis à une évaluation spécifique.

- Une autre série de questions s'intéresse à la possibilité de **détecter** les produits d'une technique donnée **tout en identifiant** la technique utilisée. Si les techniques moléculaires de détection ne permettent pas de distinguer les techniques mises en œuvre et qui sont à l'origine des produits, des

¹⁶ Une expression plus durable est possible, par une intégration dans le génome par transgénèse ou par intégration ciblée de type SDN3. Le caractère non permanent de la modification est de nouveau observé si l'on élimine le transgène par ségrégation.

méthodes de **traçabilité** non liées à l'ADN (traçabilité technique ou « papier ») pourraient donner des indications si nécessaire.

Comme évoqué précédemment, la législation européenne est débattue dans le cadre de l'évolution continue des techniques de modification génétique. Il a été notamment proposé une réglementation reposant sur les caractéristiques des produits obtenus plutôt que sur les caractéristiques des techniques utilisées pour les générer. La question d'une évaluation se pose également si l'on ne peut distinguer un organisme d'un autre qui serait obtenu par des pratiques non soumises à évaluation.

Les tableaux ci-après, les commentaires et la synthèse qui les suivent donnent des éléments pour éclairer les autorités compétentes françaises en vue des discussions qui seront menées sur le plan européen.

<i>Techniques</i> <i>Questions</i>	SDN1 (mutation site-spécifique)	SDN2 (conversion allélique)	SDN3 (insertion de séquence)	ODM (mutagenèse dirigée par oligonucléotide)
Détection de la modification de l'ADN¹⁷	Oui	Oui	Oui	Oui
Insertion stable d'ADN	Non	Non	Oui	Non
Identification de la méthode d'obtention	Non	Non : variant naturel. Possible si la modification est combinée à une « signature moléculaire ¹⁸ ».	Non s'il existe un équivalent naturel. Parfois possible si combinée à une « signature moléculaire ¹⁸ ».	Non : cas général. Possible : si la modification est combinée à une « signature moléculaire ¹⁸ ».
Possibilité d'obtention par une technique listée dans l'Annexe 1B de la directive 2001/18/CE	Oui	Oui	Non, sauf en cas de modification pouvant avoir lieu naturellement ou être induite par mutagenèse.	Oui
Risque propre par rapport à une technique classée dans l'Annexe 1B	Non ¹⁹	Non ¹⁹	Possible pour certaines séquences.	Non ¹⁹
Coexistence au champ : détection	Oui ²⁰ et si phénotype ou caractère absent de la zone de culture.	Oui ²⁰ et si signature moléculaire ou si caractère absent de la zone de culture.	Oui ²⁰ : cas classique	Oui ²⁰ et si phénotype ou caractère absent de la zone de culture.
Attribution de la modification à une technique dans les filières	Non	Possible dans la filière uniquement si signature moléculaire.	Non, sauf si séquence exogène à la plante.	Non. Possible dans la filière uniquement si « signature moléculaire ».
Avantage perçu de la technique	Précision, temps raccourci d'obtention des variétés.	Précision, temps raccourci d'obtention des variétés.	Précision de la localisation du gène introduit, temps raccourci d'obtention des variétés.	Précision, temps raccourci d'obtention des variétés.
Objectifs possibles en agronomie	Inactivation de gène : modification de phénotype.	Introduction d'une variation naturelle ²¹ d'intérêt dans une variété existante.	Ajout d'un gène exogène ou modification d'expression d'un gène existant ayant un intérêt. Insertion multiple de gènes.	Inactivation de gène : modification de phénotype. Introduction d'une variation naturelle.

¹⁷ L'identification de la modification génétique dans le génome des organismes n'est pas indicative de la méthode d'obtention.

¹⁸ Une signature moléculaire consisterait en l'introduction de plusieurs nucléotides définis et dont l'association aurait une probabilité faible. Ainsi, il serait possible d'attribuer la mutation apportée à une technique et non à la simple sélection d'un variant naturel.

¹⁹ Le produit qui fera l'objet d'une commercialisation aura été caractérisé sur le plan moléculaire.

²⁰ Oui, si transfert de la modification, point variant selon le mode de pollinisation de la plante.

²¹ Variation naturelle : utilisation de la variabilité génétique de la biodiversité par exemple.

Techniques Questions	Greffon non modifié sur pied SDN1, 2 ou ODM	Greffon non modifié sur pied SDN3 ou transgénèse	Greffon modifié (SDN1, 2, 3, ODM, cis et intragénèse) sur pied non modifié
Détection de la modification de l'ADN	Oui pour le pied. Non pour le greffon et les fruits.	Oui pour le pied. Non pour le greffon et les fruits.	Possible pour le greffon. Se reporter aux techniques de modification (tableau page précédente)
Insertion stable d'ADN recombinant	Non	Oui pour le pied	Possible : SDN3, cisgénèse et intragénèse.
Identification de la méthode d'obtention	Non pour toute la plante, sauf pour le pied si signature moléculaire.	Possible pour le pied ²² . Non : Pour le greffon et les fruits.	Voir tableau précédent.
Possibilité d'obtention par une technique listée dans l'Annexe 1B de la directive 2001/18/CE	Oui	Non, sauf certaines cisgénèses.	Voir le tableau précédent pour chaque technique.
Risque propre par rapport à une technique classée dans l'Annexe 1B	Non ²³	Possible selon la séquence introduite.	Voir le tableau précédent pour chaque technique.
Coexistence au champ : détection	Fruits et gamètes non modifiés.	Fruits et gamètes non modifiés.	Voir le tableau précédent pour chaque technique.
Attribution de la modification à une technique dans les filières	Non	Non pour les produits issus du scion.	Voir le tableau précédent pour chaque technique.
Avantage perçu de la technique	Précision, temps court d'obtention des variétés.	Précision, temps court d'obtention des variétés.	Précision, temps court d'obtention des variétés.
Objectifs possibles en agronomie	Inactivation de gène : modification de phénotype. Introduction d'une variation naturelle.	Ajout d'un gène exogène ou modification d'expression d'un gène existant ayant un intérêt.	Modification d'un gène existant ou de son expression ou ajout d'un gène exogène.

²² Voir le tableau des SDN3 pour des cas particuliers de difficulté de détection.

²³ Voir note 19, il est ici considéré que le produit qui fera l'objet d'une commercialisation aura été caractérisé au laboratoire.

<i>Techniques</i> <i>Questions</i>	<i>RdDM</i> (méthylation ciblée de l'ADN)	<i>Agroinfiltration</i>	<i>Cisgenèse</i> (introduction d'ADN d'une espèce sexuellement compatible)	<i>Intragenèse</i> (introduction d'ADN recombinant d'une espèce sexuellement compatible)
Détection de la modification de l'ADN.	Oui : techniquement complexe.	Oui	Oui	Oui
Insertion stable d'ADN recombinant	Selon la technique	Non	Oui	Oui
Identification de la méthode d'obtention	Oui si transgénèse. Non : ARN, CRISPR.	Oui, transitoire	Oui si transgénèse ou « signature moléculaire ». Non dans le cas de modifications génétiques pouvant avoir lieu naturellement.	Oui
Possibilité d'obtention par une technique listée dans l'Annexe 1B de la directive 2001/18/CE	Oui	Non, mais question non pertinente : en majorité expression transitoire.	Possible dans certains cas	Non
Risque par rapport à une technique classée dans l'Annexe 1B	Selon la méthode.	Non : la plante est détruite pour extraction.	Non pertinent	Non pertinent
Coexistence au champ : détection	Héritabilité non stable et dont la contribution au profil des gamètes est variable selon la plante.	Non pertinent car utilisation confinée.	Transfert selon le mode de pollinisation de la plante.	Transfert selon le mode de pollinisation de la plante.
Attribution de la modification à une technique dans les filières	Non	Non. Détection possible de fragments aléatoires du transgène.	Oui : cas classique.	Oui : cas classique.
Avantage perçu de la technique	Modulation d'expression de gènes.	Expression forte et brève.	Temps court d'obtention des caractères.	Temps court d'obtention des caractères.
Objectifs possibles en agronomie	Sélection de plantes exprimant des caractères d'intérêt.	Production de molécules d'intérêt y compris pharmacologique.	Ajout d'un gène exogène ou modification d'expression d'un gène existant ayant un intérêt.	Ajout d'un gène exogène ou modification d'expression d'un gène existant ayant un intérêt.

Tableau n°1 : réponses par techniques aux différentes questions soulevées par les NPBT.

Commentaires généraux :

Le CS rappelle que détecter une modification génétique ne signifie pas que l'on puisse toujours indiquer avec certitude les mécanismes moléculaires à l'origine de sa présence dans le génome étudié. Le plus souvent, seule l'introduction d'une séquence construite *in vitro* (recombinante) exogène au génome parental peut être tracée. De plus, l'utilisation d'une technique moléculaire de modification génétique n'est pas obligatoirement associée à un risque biologique.

Le CS observe que les techniques continuent à évoluer²⁴. Les opérateurs choisissent le plus souvent de conduire une série de contrôles en laboratoire, préalablement à une commercialisation. Pour les techniques ciblées, les contrôles visent en particulier à s'assurer de la spécificité de la modification. Les critères de validation avant la poursuite du développement sont moléculaires et phénotypiques. Des contrôles règlementaires seraient possibles à ce stade.

Le CS note que certains caractères sélectionnés seront associés à des pratiques agronomiques liées à l'utilisation de produits phytopharmaceutiques. Le fait d'avoir obtenu ces caractères par une des NPBT ne modifie pas le cadre réglementaire d'utilisation de ces substances actives.

D'une façon générale, les ressources génétiques disponibles dans le domaine de la sélection végétale seront un élément clé de l'utilisation des techniques. **Il est donc important de préserver les ressources génétiques et leur accès selon les modalités en cours actuellement.** Sans présager des arbitrages à venir, les dispositifs existants, le Certificat d'Obtention Variétale par exemple, pourront continuer à fonctionner.

Pour les approches de thérapie génique utilisant les techniques de type SDN, l'ANSM²⁵, le CAT²⁶ et l'EMA²⁷ évalueront les conditions de leur utilisation.

Commentaires sur le tableau n°1 :

SDN1 et ODM (tableau page 8) : ces techniques génèrent des modifications et secondairement des produits identiques à ceux obtenus par les méthodes de mutagenèse classique. Il sera donc particulièrement difficile de dire comment ces organismes ont été obtenus, et en particulier, il ne sera pas possible de distinguer ces plantes avec certitude de plantes obtenues par croisements ou sélection. Le tableau n°1 (page 7) rappelle que la mutagenèse ou des croisements conventionnels pourraient produire les mêmes plantes à partir de ressources génétiques « sauvages » : ces nouvelles techniques permettent simplement de gagner du temps pour la création d'une variété.

De même, en termes d'étiquetage, si plusieurs produits, qui auraient été obtenus par des techniques différentes, existent, la question de la détection pourrait être complexe dans les filières de transformation. L'application de l'Annexe 1B de la directive 2001/18/CE est donc adaptée.

Ainsi, étant donné que les produits obtenus seront similaires à d'autres générés par des approches actuellement exemptées d'étude, voire catégorisées non-OGM, il serait logique qu'ils ne soient pas soumis aux évaluations des OGM.

Dans ce contexte, le CS note que la revendication d'une propriété basée sur la simple détection moléculaire ne sera pas suffisante et pourrait faire appel à des éléments de traçabilité documentaire.

²⁴ Pour le système CRISPR/CAS9, plusieurs publications récentes indiquent qu'aucune mutation hors cible n'a été détectée après utilisation de la technique.

²⁵ Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

²⁶ Comité des médicaments de thérapie innovante de l'Agence européenne des médicaments

²⁷ Agence européenne des médicaments (en anglais : *European Medicines Agency*, EMA)

SDN2 (tableau page 8) : la situation est identique à SDN1 sur l'ensemble des points, mais les obtenteurs pourraient choisir d'introduire des « signatures moléculaires » de traçabilité afin de consolider une revendication de propriété. **Cette question, n'est pas une question de risque qui impliquerait une évaluation mais une question de propriété.**

SDN3 (tableau page 8) : le gène ou la séquence introduite pourra être clairement identifiable, par exemple si il/elle est exogène à la plante. Leur identification sera plus complexe s'ils sont l'équivalent d'une duplication génique naturelle ou induite. Dans le cas d'un gène exogène à la plante, le plus logique pourrait être une intégration aux principes d'évaluation des OGM. Le concept de site d'intégration « sûr » et ayant été caractérisé comme tel ne fait pas consensus.

Pour le SDN3 dans un contexte de cisgène, la majorité des situations correspondrait à une situation de duplication observable naturellement, et pourrait bénéficier des mêmes conditions de mise en œuvre.

Par souci de clarté, un membre du CS a souhaité que le raisonnement de prise en compte des mutations hors cible²⁸ (*off target*) soit exposé. Le paragraphe suivant aborde la question des mutations hors cible et leur impact dans un cadre réglementaire :

Le CS note que les mutations hors cible sont un point qui relève d'une question avant tout technique, en cours de changements et d'améliorations importants. Par exemple, le système CRISPR/Cas9 a beaucoup évolué depuis sa première utilisation (nickase, redéfinition des guides, ... et plus récemment protéines issues d'autres souches bactériennes).

Il existe des moyens moléculaires et phénotypiques de trier, au laboratoire, en serre ou en champ lors d'essais, les organismes qui seront l'objet des développements ultérieurs.

Les mutations hors cible peuvent être identifiées par séquençage. **Attention néanmoins, comme les techniques s'améliorent, en-deçà d'un seuil, le nombre des modifications hors cible ne sera pas différent de celui des variations naturelles de séquence, il ne sera alors pas possible de faire une différence avec ces variations naturelles.**

Le CS propose donc de considérer que les techniques SDN1 et 2 et ODM relèvent du même champ que la mutagenèse (annexe 1B de la directive 2001/18/CE) :

- soit elles sont "précises" et les techniques les ayant produites les rendent non distinguables de variants naturels ou de mutants obtenus par mutagenèse après sélection ;
- soit elles sont peu précises, dans ce cas, comme pour la mutagenèse, les produits seront croisés avec des variétés conventionnelles pour y introgresser le gène muté. Le CS indique que le nombre de mutations à trier sera considérablement plus faible ;
- sur le plan de la détection et de l'identification de l'origine des plantes, les mutations hors cible, quel que soit leur nombre, ne peuvent pas, à coup sûr, certifier à elles seules du type de technique utilisée pour obtenir la plante.

La greffe (Greffon non modifié sur pied SDN1, 2 ou ODM / Greffon non modifié sur pied SDN3 / Greffon modifié (SDN1, 2, 3, ODM, cis et intragène) sur pied non modifié) (tableau page 9) : la question des échanges entre greffon et porte-greffe est à considérer. A ce jour, il est accepté que le porte-greffe ne contribue pas à la formation des cellules des organes de reproduction du greffon et donc aux gamètes et fruits qui en seraient issus.

²⁸ Les fiches de chaque technique de SDN exposent ce point et les moyens de les détecter. Il s'agit principalement des techniques de large spectre d'analyse comme le séquençage à haut débit (NGS).

Le CS souligne la pertinence d'une évaluation différenciée pour le greffon et le porte-greffe. Ainsi, le fondement moléculaire de l'évaluation ou de l'exemption d'évaluation peut rester directement lié à la technique de la composante modifiée, la greffe ne modifiant pas les éventuels effets propres qui concerneraient la santé ou l'environnement.

Les préconisations du tableau n°1 sont transposables à certaines combinaisons de cette section.

Les fruits ou graines de plantes non génétiquement modifiées mais issus de porte-greffes modifiés ne nécessitent pas d'évaluation environnementale ou sanitaire propre ; le porte-greffe est évalué selon sa modification.

RdDM (tableau page 10) : les modifications épigénétiques sont observées en conditions naturelles, elles sont le plus souvent le résultat d'une adaptation à des changements d'environnement. Dans ce contexte, elles sont le plus souvent réversibles. Cette réversibilité peut advenir après transmission à un nombre variable de générations. Par ailleurs, les modifications génétiques seront maintenues tant que le contexte environnemental à l'origine de ces modifications perdurera. Les modifications induites par la technique de RdDM ont pour objectif d'orienter ces adaptations, mais ne reposent pas sur des mécanismes différents de ceux mis en œuvre par un organisme non modifié.

En l'absence d'un transgène, une plante portant des modifications épigénétiques ne relève pas d'une évaluation systématique calquée sur le modèle des OGM.

Agroinfiltration (tableau page 10) : l'agroinfiltration *stricto sensu* considérée par la Commission Européenne ne recouvre pas la transformation de tissus germinaux (voir fiche) et n'est pas destinée à produire une descendance d'OGM. Les agrobactéries utilisées sont des MGM (Micro-organismes Génétiquement Modifiés) et sont donc régulées en tant que tels.

Si on ne peut exclure la transformation stable de cellules germinales, celles-ci ne feront pas l'objet d'une sélection pour la régénération d'OGM.

Cisgenèse et intragenèse (tableau page 10) : la question de la cisgenèse, ou de l'intragenèse, doit bénéficier d'une analyse moléculaire spécifique : les modifications qui ne seraient pas différenciées de celles issues d'un événement qui pourrait être obtenu par sélection « classique », devraient être considérées dans la même catégorie que ce dernier. En ce sens, une évaluation équivalente à celle proposée dans le cadre de l'autoclonage²⁹ pour les microorganismes pourrait être proposée. Sur la base de cette analyse, les organismes entreraient ou non dans le régime d'évaluation des OGM.

Ségrégants négatifs de modifications génétiques (élément non présenté dans le tableau) : en sélection végétale, l'élimination d'un événement de modification génétique, quelle qu'en soit l'origine (croisements conventionnels, transgenèse, SDN3, Cis ou intragenèse, agroinfiltration...), est une procédure classique. **Après confirmation moléculaire de l'exclusion de la modification**, la plante

²⁹ L'autoclonage mentionné à l'article D. 531-2 du code de l'environnement, consiste en la suppression de séquences de l'acide nucléique dans une cellule d'un organisme, suivie ou non de la réinsertion de tout ou partie de cet acide nucléique ou d'un équivalent synthétique, avec ou sans étapes mécaniques ou enzymatiques préalables, dans des cellules de la même espèce ou dans des cellules d'espèces étroitement liées du point de vue phylogénétique qui peuvent échanger du matériel génétique par le biais de processus physiologiques naturels. Cette technique n'est pas considérée comme donnant lieu à une modification génétique, à condition qu'elle n'implique pas l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés en tant qu'organismes récepteurs ou parentaux, et si le micro-organisme qui en résulte ne risque pas de causer des maladies pouvant affecter l'homme, les animaux ou les végétaux et s'il est utilisé en milieu confiné. Pour qu'un micro-organisme puisse être considéré comme résultant d'une opération d'autoclonage, le HCB devra obligatoirement être consulté et une demande de classement devra lui être adressée. Seuls les micro-organismes receveurs de classe 1 sont concernés par l'autoclonage.

résultante devrait être exemptée d'évaluation des risques et pourrait être considérée comme une plante obtenue par sélection conventionnelle.

Il est à noter que les techniques évaluées s'inscrivent dans des objectifs qui peuvent être complémentaires au sein d'une même stratégie d'amélioration d'une plante et peuvent faire l'objet de combinaisons. Le tableau ci-dessous propose quelques exemples.

<i>Technique 1</i> <i>Technique 2</i>	<i>Transgénèse</i> <i>« classique »</i>	<i>Agroinfiltration</i>	<i>Cisgénèse/</i> <i>Intragenèse</i>	<i>Ségrégants</i> <i>négatifs</i>
<i>SDN1, 2</i>	Non pertinent	Oui modification possible sur le plasmide porté par l' <i>Agrobacterium</i> qui reste MGM ³⁰ du fait du transgène.	Non pertinent	Oui, si les gènes nécessaires à la technique ont été intégrés. Le produit relève de SDN1,2.
<i>ODM</i>	Non pertinent	Non pertinent	Non pertinent	Non pertinent
<i>SDN3</i>	Oui mais ciblage	Modification possible sur le plasmide porté par l' <i>Agrobacterium</i> qui reste MGM ³⁰ du fait du transgène.	Caractéristiques de l'organisme liées au ciblage et au transgène.	Oui, si les gènes nécessaires à la technique ont été intégrés. Le produit relève de SDN3
<i>RdDM</i>	Si associé aux ségrégants négatifs, voir le cas. Si non évaluation classique.	Non pertinent	Non pertinent	Possible

Tableau n°2 : Exemples d'associations de « techniques ».

4. Conclusions / synthèse

Nonobstant la diversité des situations exposées dans le présent document, les travaux du CS peuvent se résumer ainsi :

- En sélection végétale, l'élimination d'un événement de modification génétique par ségrégation négative de modifications génétiques, quelle qu'en soit l'origine (croisements conventionnels, transgénèse, SDN3, cisgénèse ou intragenèse, agroinfiltration...), est une procédure classique. Après confirmation moléculaire de l'exclusion de la modification, la plante résultante devrait être exemptée d'évaluation des risques et pourrait être considérée comme une plante obtenue par sélection conventionnelle.
- Toute technique qui permet de produire une plante non distinguable d'une autre plante de même espèce et qui aurait pu être obtenue par « croisement conventionnel » ou par sélection de

³⁰ MGM : Micro-organismes Génétiquement Modifiés

mutants (naturels ou induits) ne devrait pas faire l'objet d'une étude systématique calquée sur le modèle des OGM. Ceci concerne : SDN1, SDN2, ODM et les ségrégants négatifs.

- Les fruits ou graines de plantes non génétiquement modifiées mais issus de porte-greffes modifiés ne nécessitent pas d'évaluation environnementale ou sanitaire propre ; le porte greffe est évalué selon sa modification.
- En l'absence d'un transgène, une plante portant des modifications épigénétiques ne relève pas d'une évaluation systématique calquée sur le modèle des OGM.
- L'utilisation de l'agroinfiltration en milieu confiné, et lorsqu'aucune descendance n'est produite, ne génère pas d'OGM³¹.
- Certaines formes de cisgenèse/intragenèse pourraient bénéficier, au cas par cas et après examen des constructions, d'une exemption d'évaluation (comme dans le cas d'autoclonage pour les micro-organismes).

En complément d'analyse, le CS du HCB note que l'intérêt de ces techniques peut être considéré sur deux aspects. Sur le plan de la recherche et de la production de connaissances, les techniques de type SDN sont aujourd'hui un **outil incontournable dans les laboratoires**. Ces techniques permettent d'accéder à des données inaccessibles jusqu'alors. Sur le plan des acteurs de l'agronomie, l'utilisation des techniques de type SDN devrait permettre une **adaptation rapide** à certaines modifications des conditions du **marché (au sens de besoins en productions variétales) ou de l'environnement (résistance à une maladie, par exemple)**.

Les travaux d'études visant à répondre aux interrogations en matière de **propriété intellectuelle** pourront s'appuyer sur la base des données moléculaires et biologiques, ce point pourra faire l'objet d'études juridiques spécifiques. Le CS du HCB rappelle que l'impossibilité de déterminer l'origine d'une modification génétique est un facteur à considérer, tant en matière de propriété intellectuelle que de traçabilité dans les filières.

Il est à noter que les questions abordées dans ce document seront revues sous un angle plus large dans le cadre d'une contribution ultérieure du HCB. A cette occasion, le champ des modifications explorées pourra être étendu.

³¹ Le cas de l'utilisation de l'agroinfiltration en champ ouvert est exclu de cette considération.

**ANNEXE 1 : FICHES DESCRIPTIVES DES
« NOUVELLES TECHNIQUES »**

GLOSSAIRE

AAV : Adeno associated virus : virus adéno-associé

ADN-T : ADN de transfert.

CAS9 : CRISPR ASsociated protein 9 : protéine à activité endonucléase effectrice du locus CRISPR.

CRISPR : Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées.

DSB : Double strand break, cassure double brin.

GM : Génétiquement modifié.

HR : Homologous recombination, recombinaison homologue.

IDLV : Integration deficient lentiviral vectors, vecteurs lentiviraux non intégratifs.

KO : Knockout, invalidation génique.

NHEJ : Non-homologous end joining, jonction d'extrémités non homologues.

ORF : Open-reading frame : phase ouverte de lecture.

QTL : Quantitative trait locus, loci de caractères quantitatifs.

RDO : Chimeric RNA/DNA oligonucleotides, oligonucléotides chimériques d'ARN/ADN

SDO : Single stranded DNA oligonucleotide, oligonucléotides simples brin d'ADN

SNP : Single-nucleotide polymorphis, Polymorphisme nucléotidique.

TALEN : Transcriptor activator like effector nuclease, nucléase effectrice de type activateur de transcription.

ZFN : Zinc finger nuclease, nucléase à doigts de zinc.

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 (transgenèse 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.

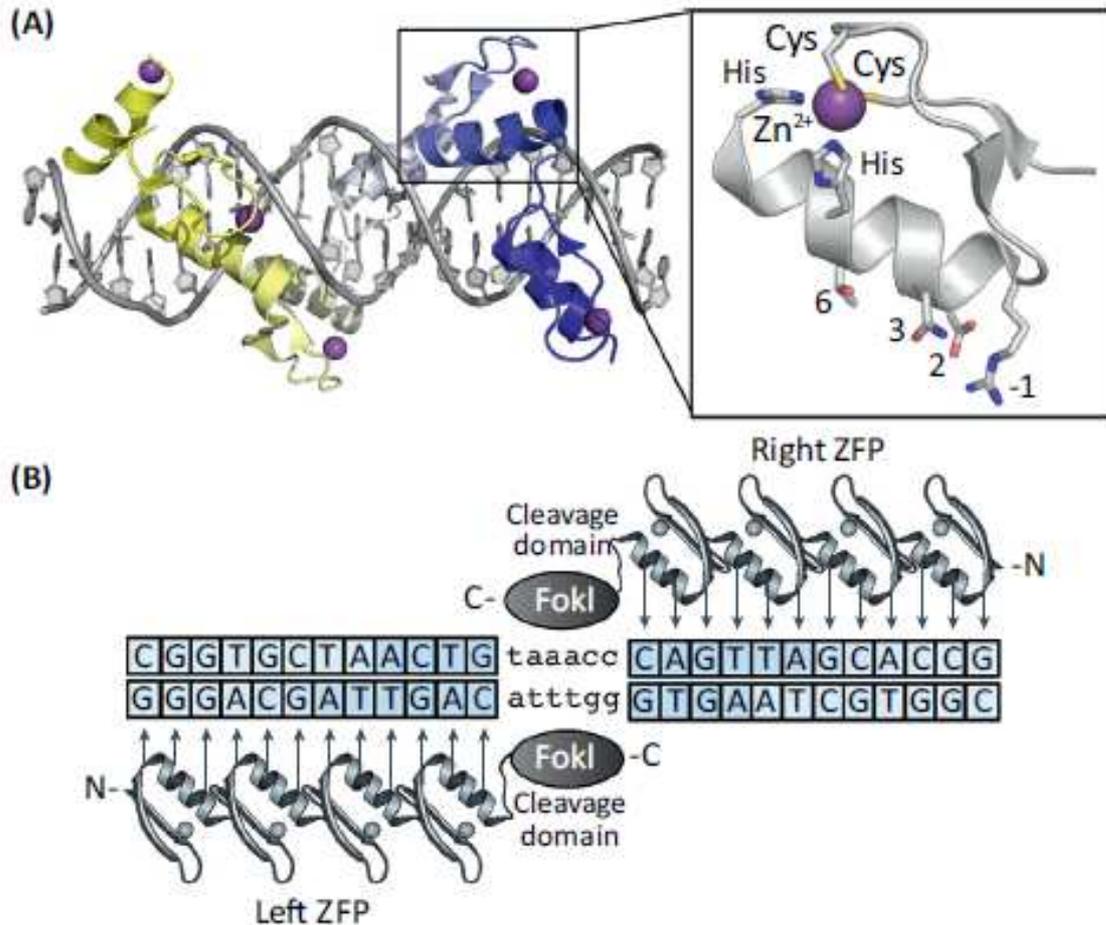


Figure 1 : structure d'un doigt de zinc (Gaj et al., 2013).
 (A) Protéine à doigt de zinc complexée avec l'ADN cible (gris) (PDB ID: 2I13).
 (B) Schéma d'un dimère de zinc finger nuclease (ZFN) lié à l'ADN.

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.

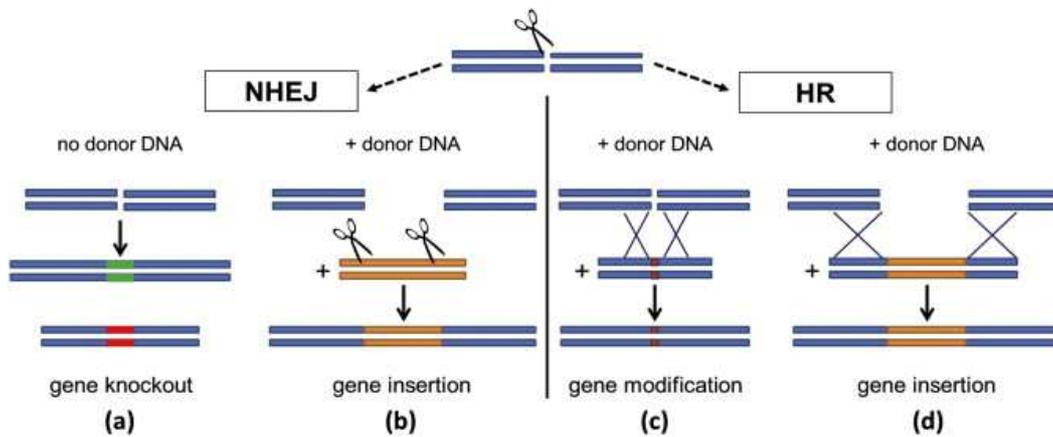


Figure 2 : Edition ciblée du génome avec les nucléases (Bortesi and Fischer, 2015).

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)

Phase d'avancement :

Chez les végétaux :

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, [Sangamo BioSciences, 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
	(Geurts et al., 2009)	Microinjection d'embryon
Rat	(Chen et al., 2014)	Microinjection d'embryon
Souris	(Anguela et al., 2013)	AAV
	(Doyon et al., 2008)	
Zebrafish	(Beumer et al., 2008)	
Drosophile	(Takasu et al., 2010)	Injection d'ARNm
B.mori	(Chen et al., 2014)	Transfection
Mouton	(Curtin et al., 2013)	
Soja	(Ainley et al., 2013)	Bombardement
Mais	(Marton et al., 2010)	Virus du «rattle» du tabac
Tabac	(Marton et al., 2010)	Virus du «rattle» du tabac
Petunia	(de Pater et al., 2013)	«floral dip», ou trempage floral dans une suspension d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Arabidopsis		

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 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.

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., Baltus, 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).

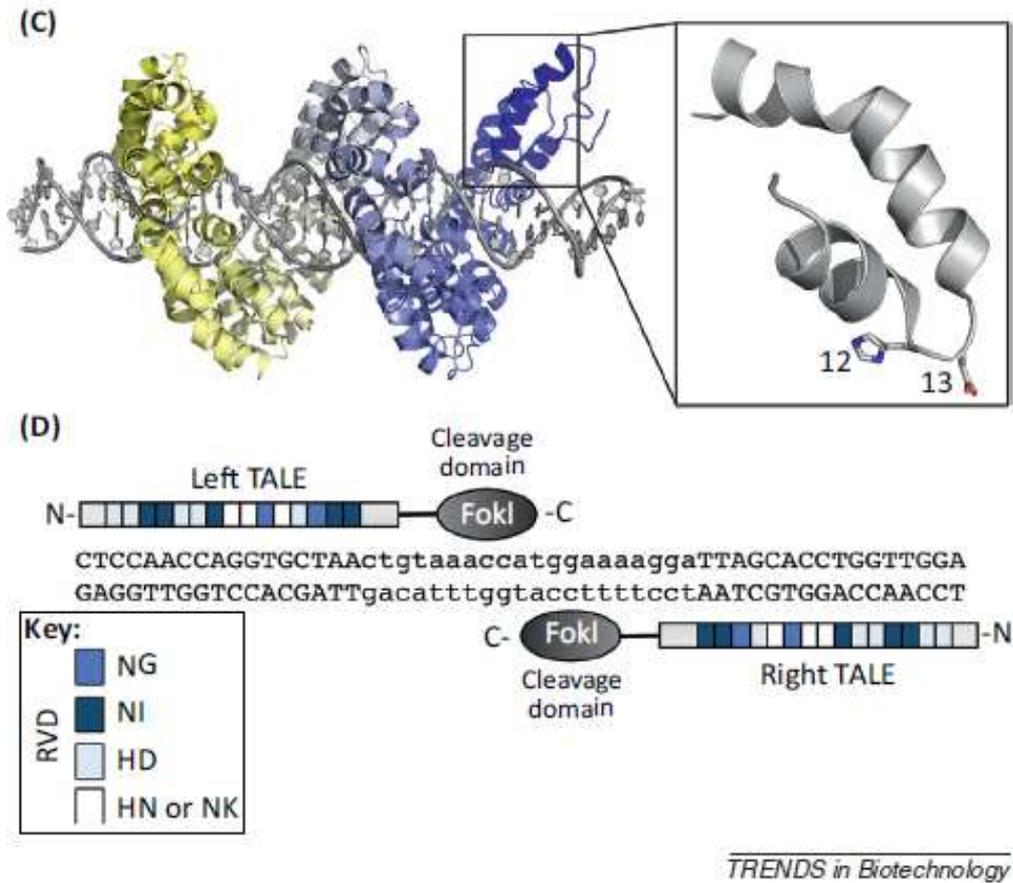


Figure 1 : Structure d'un « transcription activator-like effector » (TALE) (Gaj et al., 2013).

(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.

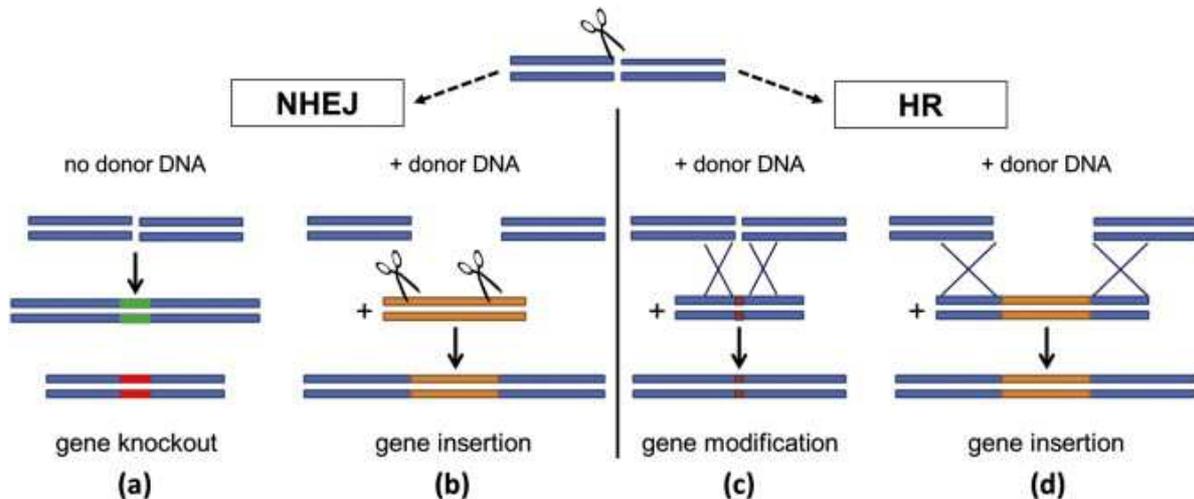


Figure 2 : Edition ciblée du génome avec les nucléases (Bortesi and Fischer, 2015).

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)

Phase d'avancement :

Chez les végétaux

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.

Chez les autres organismes :

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.

Recherche fondamentale :

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
<i>Caenorhabditiselegans</i>	(Wei et al., 2013)	
<i>B. mori</i>	(Wang et al., 2013)	
Souris	(Wefers et al., 2013)	Microinjection d'ARNm
Riz	(Li et al., 2012)	Transfection
<i>Arabidopsis</i>	(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 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 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 MGG* *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 homologe (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.

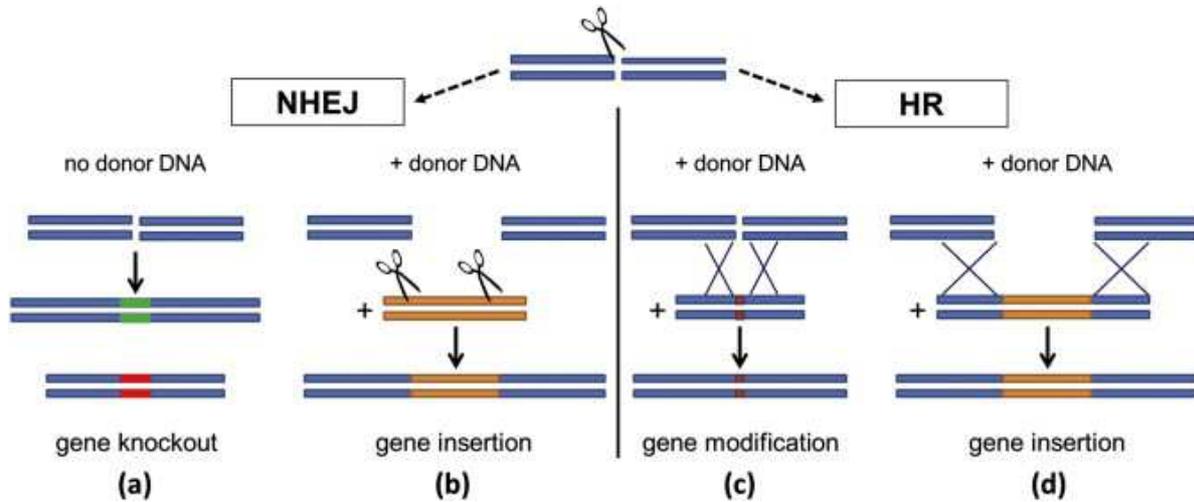


Figure 1 : Edition ciblée du génome avec les nucléases (Bortesi and Fischer, 2015).

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).

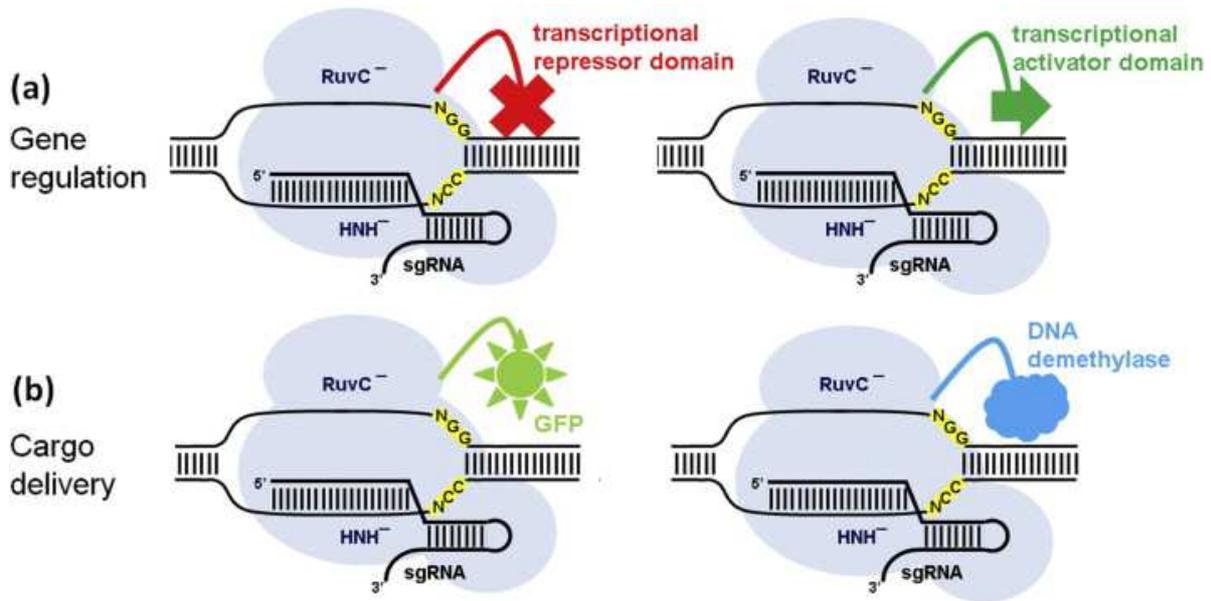


Figure 2 : Applications du système CRISPR/cas au delà de l'édition du génome (Bortesi and Fischer, 2015).

(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)).

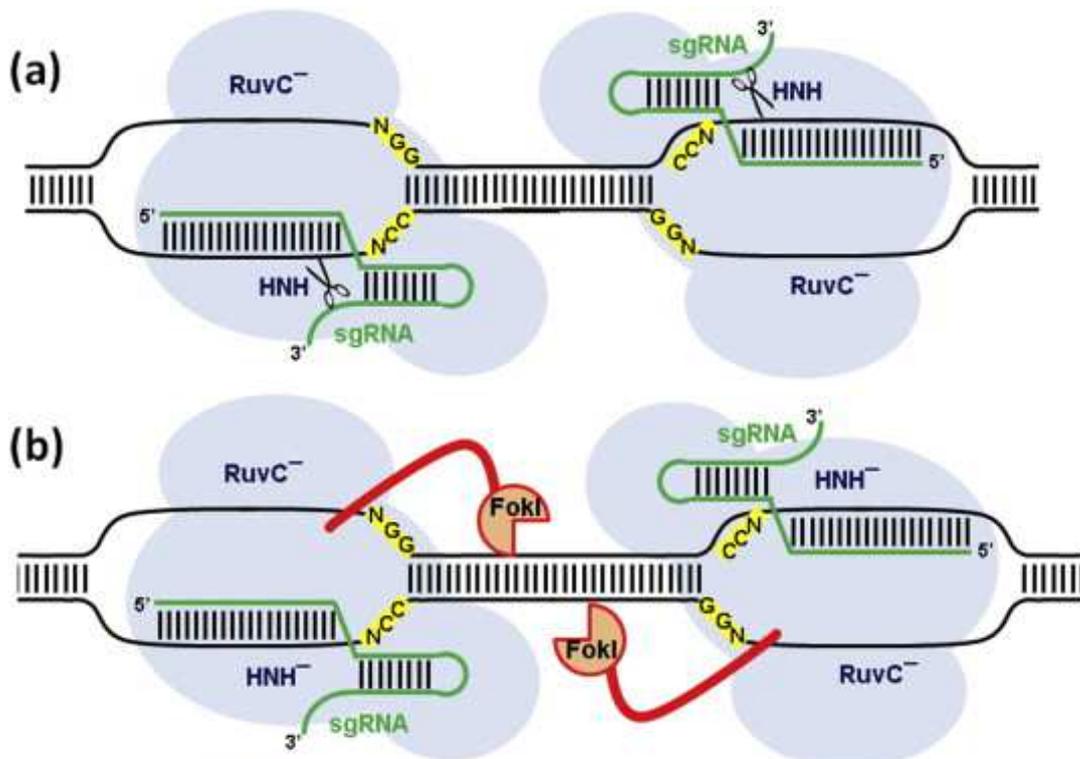


Figure 3 : Stratégies pour augmenter la spécificité du système CRISPR/Cas9 (Bortesi and Fischer, 2015).

(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)

Phase d'avancement :

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

Chez les végétaux :

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.

Chez les autres organismes :

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.

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.

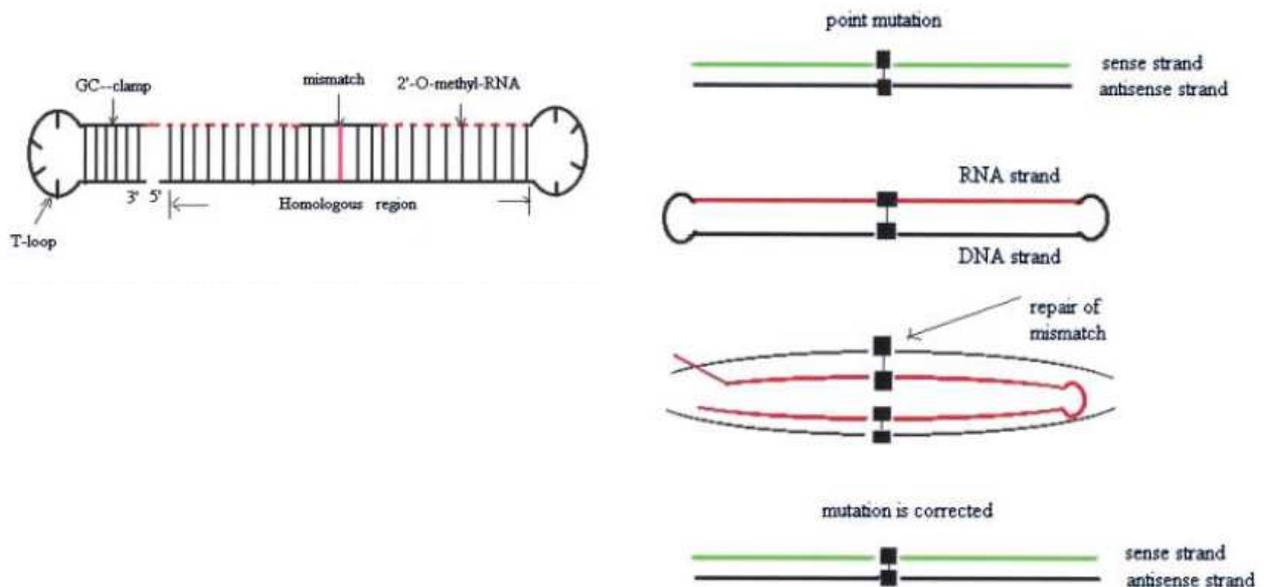


Figure 1 : Diagramme de la structure du RDO (gauche) mécanisme du RDO (droite) (Liang et al., 2002)

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)

Phase d'avancement :

Chez les végétaux :

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*).

Chez les autres organismes :

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.

Recherche fondamentale :

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)

Phase d'avancement :

Chez les végétaux :

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 connue.

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

Chez les animaux :

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 (génome 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 :
 - o pour étudier les interactions plante-pathogène, en clonant notamment des génomes entiers de virus ou des réplicons dans l'ADN-T ;
 - o 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) ;
 - o pour analyser la fonction de gènes encore inconnus (notamment par extinction de gène induite par virus / Virus-Induced Gene Silencing (VIGS), ou par interférence) ;
 - o 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)

Phase d'avancement :

Chez les végétaux :

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)

Phase d'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).

Recherche fondamentale :

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 cisgénèse 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 cisgènèse et l'intragènèse 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 transgènèse peuvent être utilisées pour transférer le gène.

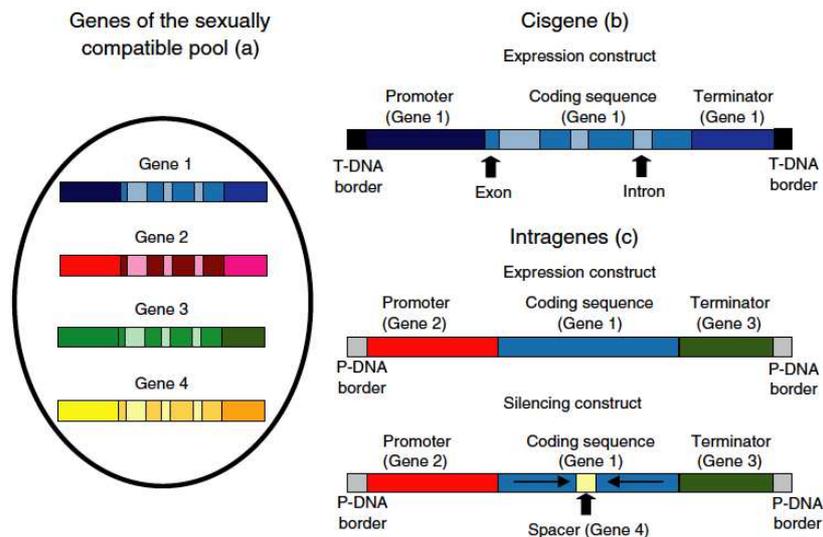


Figure 1 : Illustration des constructions génétiques utilisables pour la cisgènèse et l'intragènèse³⁶.

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'intragènèse (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)

Phase d'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., Brogгинi, 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 échangent 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 (seed production technique) :

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).

Reverse breeding :

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).

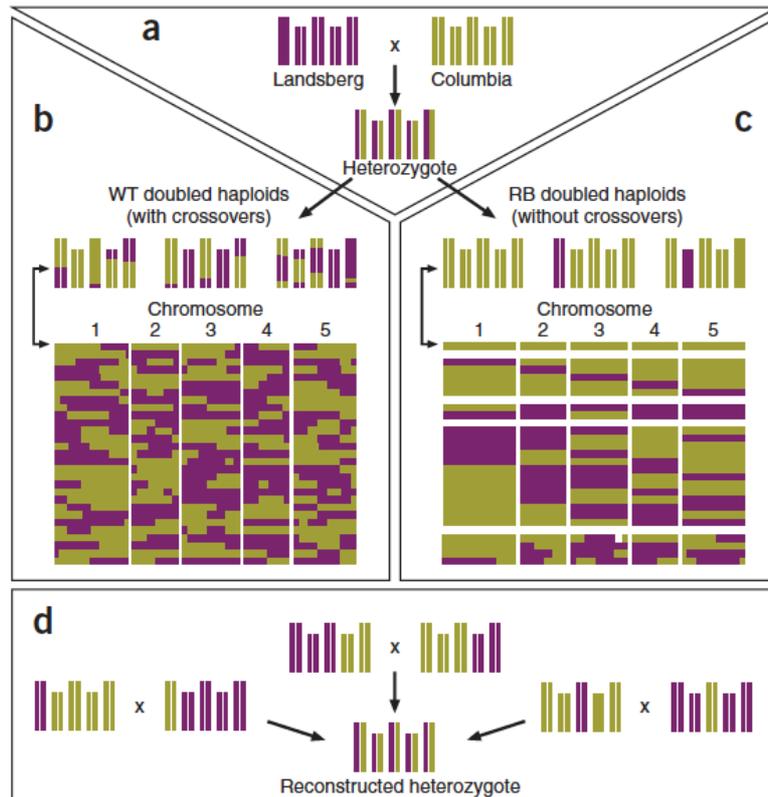


Figure 1 : Stratégie du reverse breeding, génotypes du descendant sauvage (WT) et du descendant double haploïde. (Wijnker et al., 2012) (a) Le reverse breeding commence avec une plante hétérozygote dans laquelle la recombinaison méiotique peut être supprimée. (b) Génotype de 29 plantes sauvages doubles 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.

Flowering time reduction :

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)

Phase d'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 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 ségrégants 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.

Bibliographie

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**, 60–68.

FICHE NOUVELLES TECHNIQUES

TRANSGÉNÈSE VÉGÉTALE

Présentation générale de la technique (Grand public)

La transgénèse chez les végétaux résulte du transfert, de l'insertion stable et héritable de gène(s) dans le génome de cellules végétales. Elle a pour objectif, par exemple, l'expression de caractères nouveaux dans une plante, ou la suppression de l'expression de certains caractères de la plante. En général, la plante transgénique est obtenue par transfert du gène (ou des gènes) dans des cellules végétales, suivie de la régénération d'une plante entière et de la sélection des plantes transformées. Le critère de sélection est la conservation des caractéristiques initiales de la plante associée à l'expression du caractère attendu.

3 éléments sont nécessaires pour générer une plante transgénique :

- un ou plusieurs gènes à transférer ;
- un vecteur permettant d'introduire l'ADN à transférer dans la cellule végétale ;
- une cellule végétale capable d'être régénérée en plante entière.

Principe et fonctionnement au niveau cellulaire et moléculaire.

- L'identification d'un ou plusieurs gènes d'intérêt à introduire dans le génome d'une plante pour lui conférer les propriétés voulues, est une étape préalable à la transgénèse. Par exemple il peut s'agir d'un gène permettant la résistance à certains insectes ou à certaines maladies, la tolérance à un ou des herbicides, l'ajout d'un caractère d'intérêt nutritionnel ou d'un caractère d'adaptation à des conditions climatiques particulières, ou encore l'expression de protéines à usage thérapeutique... Les gènes introduits peuvent donc être d'origine végétale, animale, virale, bactérienne, fongique, ou synthétique.

- **La première étape**, après identification de l'organisme donneur, consiste à intégrer le gène d'intérêt dans une construction génétique associant parfois un gène marqueur. Ce marqueur permet de sélectionner aisément les cellules qui ont intégré le gène d'intérêt.

- **La deuxième étape** consiste à transférer la construction génétique dans une cellule végétale. Il existe différentes méthodes :

- les méthodes dites directes comme la biolistique, qui consiste à bombarder les cellules de la plante par des particules de tungstène ou d'or, de diamètre micrométrique, elles-mêmes enrobées d'ADN ; ou par introduction d'ADN dans des protoplastes (cellule végétale sans paroi pectocellulosique) par action d'un agent chimique ou d'un champ électrique (électroporation). Il faut ensuite parvenir à régénérer une plante entière à partir de cette cellule végétale transformée.

- les méthodes dites indirectes, utilisent des agents bactériens, le vecteur le plus souvent utilisé est la forme désarmée d'*Agrobacterium tumefaciens* :

Cette bactérie pathogène à l'état sauvage cause, chez les plantes infectées, la formation de tumeurs principalement au niveau du collet (zone de transition entre le système racinaire et la tige feuillée). Cette maladie appelée galle du collet ou « crown-gall » résulte du transfert d'une partie d'un ADN plasmidique de la bactérie (ADN-T) dans le génome de la plante. C'est l'expression des gènes de virulence (*vir*) dans les agrobactéries qui permet le transfert de l'ADN-T dans les cellules végétales.

Agrobacterium tumefaciens réalise donc, naturellement, la transgénèse d'une partie de ses gènes dans l'organisme végétal. Une fois ce mécanisme connu, il a été utilisé en biotechnologies dans le but de transformer génétiquement des végétaux. Pour cela, il faut modifier le plasmide Ti (en construisant un plasmide "désarmé") afin qu'il n'y ait pas de formation de galle du collet (délétion des gènes responsables du pouvoir pathogène de la bactérie), mais qu'il y ait quand même transfert et intégration de gènes d'intérêt dans le génome des plantes. Il suffit pour cela de garder intactes les deux frontières gauche et droite de l'ADN-T, ainsi que les fonctions de virulence. Le(s) gène(s) à transférer sera (ont) alors inséré(s) entre ces deux frontières et la bactérie portant cette construction pourra transférer le(s) transgène(s) dans les cellules végétales et contribuer à leur insertion dans les chromosomes des cellules végétales.

- Enfin, **la troisième étape** est la régénération : une fois l'ADN recombinant introduit dans la cellule végétale, quel que soit le vecteur utilisé, il faut régénérer la cellule modifiée en plante entière (notamment à l'aide d'hormones végétales seules ou en combinaison que l'on incorpore au milieu de culture *in vitro*) et s'assurer que le ou les gènes transférés ont été intégrés de façon stable dans le patrimoine génétique. La transformation d'*Arabidopsis thaliana* réalisée *in planta* par trempage floral permet cependant de s'affranchir des techniques de culture *in vitro*.

Modalités de mise en œuvre

Le vecteur le plus couramment utilisé pour la transgénèse végétale est le vecteur bactérien *Agrobacterium tumefaciens* désarmé.

D'autres méthodes sont utilisées pour transférer l'ADN dans la cellule végétale, par exemple :

- la méthode directe de biolistique, nécessitant des billes de tungstène ou d'or sur lesquelles l'ADN a été adsorbé au préalable,
- l'introduction 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

La transgénèse végétale trouve des applications dans différents domaines comme, la recherche, l'agriculture, la santé, l'environnement, ou encore dans l'industrie. Elle permet de générer, par exemple, des plantes :

- résistantes à certains insectes ou à certaines maladies,
- résistantes au brunissement enzymatique,
- tolérantes à des herbicides,
- tolérantes à un stress abiotique (comme la sécheresse, ou la réduction des apports hydriques),
- exprimant une protéine à usage thérapeutique,
- présentant un changement de composition nutritionnelle (par exemple, modifier la teneur en huile ou la composition en acides gras de certaines plantes),
- utiles à la remédiation des sols,
- permettant la production de plastiques biodégradables...

Avantages et contraintes par rapport aux techniques existantes

Par rapport aux méthodes d'amélioration végétale classique, la transgénèse permet l'introduction dans une plante réceptrice d'un gène provenant de tout organisme donneur, il peut même s'agir d'un gène "artificiel" (synthétique).

Un des avantages, par rapport aux méthodes plus traditionnelles faisant appel aux rétrocroisements entre espèces et que dans le cas de la transgénèse, seul le transgène est transféré dans l'espèce réceptrice.

Des méthodes de plus en plus précises et fiables, applicables pratiquement à toutes les espèces cultivées (plantes ornementales, arbres, céréales, légumes, plantes tropicales, plantes médicinales...) ont été développées pour modifier les plantes. Cependant, les méthodes décrites dans cette fiche ne permettent pas de cibler le site génomique d'intégration du transgène.

État de l'art (non exhaustif)

Phase d'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 : pas d'essai en France depuis 2013 (plusieurs centaines d'essais réalisés entre 1998 et 2013). En 2015, des essais sont en cours dans différents pays européens.

Le stade 4, correspondant au stade de la soumission AMM, pré-marketing : plantes GM ayant obtenu une AMM pour la culture et/ou l'importation, la transformation et l'alimentation humaine et animale dans l'Union européenne.

Bibliographie

Revue de référence (récentes)

Ahmad, P., Ashraf, M., Younis, M., Hu, X., Kumar, A., Akram N.A., Al-Qurainy F. (2012). Role of transgenic plants in agriculture and biopharming, *Biotechnology Advances*, 30 (3), 524-540.

Rivera, A.L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., Loske, A.M. (2012). Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews*. 9, (3), 308-345.

Ziemienowicz, A. (2014). Agrobacterium-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3 (4), 95-102.

ANNEXE 2 : élaboration de la note

Cette note a été élaborée par le CS du HCB sous la présidence du Dr Jean-Christophe Pagès et la vice-présidence du Dr Pascal Boireau et du Dr Claudine Franche. Elle l'a été à partir d'un projet de note du groupe de travail discuté et validé en séance du 16 décembre 2015 pour les questions de fond, puis sous forme d'échanges électroniques pour la forme⁴⁰.

Le CS du HCB est un comité pluridisciplinaire composé de personnalités scientifiques nommées par décret au titre de leur spécialité en relation avec les missions du HCB. Par ordre alphabétique des noms de famille, le CS du HCB est composé⁴¹ de :

Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Philippe Berny, Yves Bertheau (démissionnaire au 3 février 2016), Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno Chauvel, Denis Couvet, Elie Dassa, Hubert De Verneuil, Nathalie Eychenne, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, André Jestin, Bernard Klonjowski, Marc Lavielle, Valérie Le Corre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Eliane Meurs, Nadia Naffakh, Didier Nègre, Jean-Louis Noyer, Sergio Ochatt, Jean-Christophe Pagès, Daniel Parzy, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.

Le Groupe de Travail (GT) spécifiquement constitué pour étudier une série de techniques et leurs éventuels impacts en termes technologiques, réglementaires et de potentiel d'innovation est composé de : Claude Bagnis (membre du CS du HCB, EFS), Josep Casacuberta (expert externe, CSIC-IRTA-UAB-UB, Espagne), Philippe Guerche (membre du CS du HCB, INRA), Jean-Jacques Leguay (Vice-président du CS du HCB lors de la précédente mandature, Directeur de recherche du CNRS en biologie et physiologie végétale), Fulvio Mavilio (expert externe, Directeur scientifique de Généthon), et Jean-Christophe Pagès (Président du CS du HCB).

⁴⁰ Membres du CS présents et représentés à la séance du 16 décembre 2015 et ayant contribué à la présente note : Claude Bagnis, Marie-Anne Barny, Yves Bertheau, Pascal Boireau, Bruno Chauvel, Hubert De Verneuil, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, André Jestin, Bernard Klonjowski, Valérie Le Corre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Didier Nègre, Jean-Christophe Pagès, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte. Depuis lors, Yves Bertheau a émis une position divergente sur certains points. N'ayant pas fait l'objet de discussion en séance comme stipulé dans le règlement intérieur du HCB, cette position divergente est non recevable et n'a donc pas été incluse dans cette note. Yves Bertheau a présenté sa démission du CS et souhaité ne pas être associé au présent texte.

⁴¹ Composition du CS en vigueur suite au décret de nomination des membres du HCB du 30 décembre 2014 et à la loi du 2 décembre 2015.

SCIENTIFIC COMMITTEE
MEMORANDUM ON
NEW PLANT BREEDING TECHNIQUES

Paris, 19 January 2016

The HCB as issued a self-referral on the “new plant breeding techniques” questions. The HCB Scientific Committee has set up a working group (WG) specifically to study a range of techniques and their possible environmental, health and technological impacts.

Its work is presented in two parts:

- The first part introduces the issue and examines the questions underlying the debate on the regulation of these techniques.
- The second part consists of a set of fact sheets produced by the WG for each technique.

1. Introduction: Background and clarification of terms

The rapid expansion in new plant biotechnology, with design and use of new plant breeding techniques (NPBTs), raises a number of questions. The current NPBT debate in Europe hinges on the regulatory framework for products obtained through use of new breeding techniques, as it is unclear whether they come under the directives on GMO use¹. It is important, even critical, to settle this question if these techniques are going to be adopted by the breeders, who need an answer. It is also important to clarify the terms of the question for everyone concerned, including supply chains and consumers.

It should be noted that, because of the history of this question², the list of techniques discussed is quite heterogeneous³, and the generic term 'new plant breeding techniques (NPBTs)' may give rise to confusion. Thus:

- (1) While they all apply to plant breeding, the techniques considered are not necessarily specific to the plant kingdom (site-directed nuclease (SDN) technology, for example, or genome editing is also frequently employed for animals);
- (2) Plant breeding techniques that could be considered new and could assist in producing plants obtainable by an NPBT are not included in the list if they raise no problems regarding GMO regulation: thus the fast-developing technique of genome breeding is not considered;
- (3) These techniques are not necessarily new (grafting, for example, is an old technique, but the question arises of whether or not a genetically modified (GM) status must be ascribed to products derived from grafting of a non-GM scion onto a GM rootstock);
- (4) Some items on the list are not techniques as such but entail use of genetic modification: for example, innovative plant-breeding strategies. This consequently raises the question of their status under the regulations, as mentioned above (case of negative segregants, for example);
- (5) One last level of complexity is added by the fact that it is possible to have multiple combinations of NPBTs (see Table 2: cisgenesis targeted using SDN-3, for example).

Anticipating that the French competent authorities would ask HCB for an opinion in preparation for consultation of Member States by the European Commission, the Scientific Committee has set up a working group to:

- (1) Provide a concise, intelligible and instructive description of NPBTs, with information about their potential applications, the state of the art and their various stages of development and adoption based on talking to stakeholders (Appendix 1);
- (2) Identify the questions raised by NPBTs.

¹ The EU directives on GMO use are (1) Directive 2001/18/EC on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms, and (2) Directive 2009/41/EC on the contained use of genetically modified micro-organisms.

² Initial report by COGEM in 2006, followed by establishment of a European Commission working group and publication in a journal with a high impact factor (*Nature Biotechnology*) of the findings of a parallel investigation by Commission's Joint Research Centre (Lusser *et al.*, 2012).

³ List of NPBTs discussed by the European Commission working group: oligonucleotide-directed mutagenesis (ODM), zinc finger nuclease (ZFN) technology, cisgenesis (including intragenesis), grafting, agro-infiltration, RNA-dependent DNA methylation (RdDM), reverse breeding, and synthetic genomics.

Basing the list on the NPBTs under discussion in the European Commission, the following techniques are considered in this report⁴:

1. Genome-targeting NPBTs
 - i. Site-directed nucleases (**SDNs**⁵: **ZFN**⁶, **MN**⁷, **TALEN**⁸, **CRISPR**⁹/**Cas**)
 - ii. **Oligonucleotide-directed mutagenesis** (ODM¹⁰, RTDS¹¹, etc.)
2. Epigenetic techniques
 - i. **Gene expression control by RdDM**¹²
3. Various methods related to use of genetic engineering techniques
 - i. Specific contexts in which genetic engineering techniques are used
 - **Agro-infiltration**
 - **Grafting** of a non-GM scion onto a GM rootstock or a GM scion onto a non-GM rootstock
 - ii. New concepts relating to the nature of the modified sequence
 - **Cisgenesis / Intragenesis**
 - iii. Offspring of modified individuals whose genetic modification has been removed by segregation
 - **Negative segregants**, produced as a result of innovative breeding strategies (e.g. reverse breeding, various accelerated breeding methods, Seed Production Technology, etc.)

2. General characterisation of NPBTs

In comparison with “conventional” transgenesis, molecular targeting of genetic modifications in the genome is the most significant advance offered by some of these new techniques.

Site-directed nucleases (**SDNs**: ZFN, MN, TALEN and CRISPR/Cas9 (see Appendix 1)) can be used to target selected DNA sequences. This targeting can have three different purposes: (1) Mutation (insertion or deletion) of a single base pair or a small number of nucleotides (even several dozen) that is random **although targeted** at a specific site on the genome, **this is known as SDN-1**; (2) **Allele conversion**, modifying part or all of a gene sequence, **which is known as SDN-2**; (3) Targeted integration of a DNA sequence, **known as SDN-3**.

The diagram below shows how some of these techniques fit in with the existing landscape (Figure 1):

⁴ Each technique covered by a specific fact sheet is shown in bold type. An additional fact sheet is devoted to ‘conventional’ transgenesis for comparison purposes.

⁵ SDNs: Site-directed nucleases.

⁶ ZFN: Zinc finger nuclease.

⁷ Meganucleases (MNs) have not been covered by a fact sheet, since the working group considered the technology already to have been overtaken by other targeting tools.

⁸ TALEN: Transcription activator-like effector nuclease.

⁹ CRISPR: Clustered regularly interspaced short palindromic repeat.

¹⁰ ODM: Oligonucleotide-directed mutagenesis.

¹¹ RTDS: Rapid Trait Development System.

¹² RdDM: RNA-dependent DNA methylation.

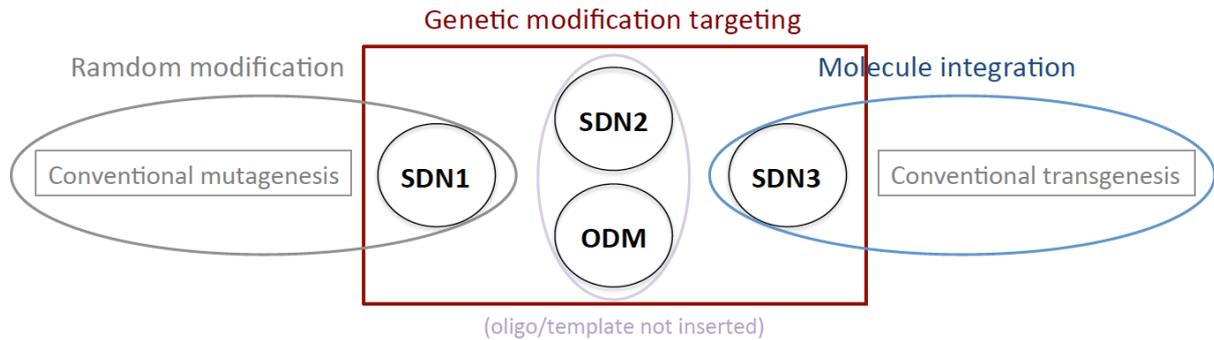


Figure 1. NPBTs: SDN-1 differs from conventional mutagenesis in that it targets a specific site, usually, but not automatically, leading to loss of function in a given gene (gene knockout). Nucleases are introduced into the cell to target a mutation site, but the nature of the mutation is not predefined. With SDN-2, a DNA template is introduced into the cell together with the site-directed nucleases, enabling the nature of the modification to be defined. The template itself is not incorporated into the genome. The same purpose can be achieved using oligonucleotide-directed mutagenesis (ODM, RTDS). SDN-3 allows targeted integration of a sequence. It is this targeting of the transgene insertion site that distinguishes this last technique from conventional transgenesis.

RNA-dependent DNA methylation (RdDM) uses epigenetic mechanisms¹³ to control expression of a given gene without altering its base sequence. In plants, the technique is employed to alter (increase or reduce) expression of an endogenous gene. This can be used to control metabolic activity, for example. It is also possible to control gene expression in an organism interacting with the plant, enabling pathogens (for example) to be targeted. **The important point to consider is the targeting of the locus of the proposed epigenetic modification.** The latter can be achieved through expression of a molecule rather than a transgene or through transient expression of a transgene or targeted proteins (e.g. agro-infiltration, CRISPR with a fusion protein having methyltransferase activity (Cas9-MT), or modification induced by a transient viral infection (VIGS)). In transient transfer¹⁴, epigenetic alteration of gene expression control could be transmitted over several generations.

The other NPBTs listed on page 89 concern methods related to use of the above techniques, not excluding 'conventional' transgenesis. They depend on the context in which they are used (agro-infiltration, grafting), the nature of the gene modified (cisgenesis/intragenesis) or their use in innovative breeding strategies resulting in removal of genetic material by segregation through conventional cross-breeding (negative segregants).

3. Questions raised by NPBTs

With regard to the current EU regulatory framework on GMOs, questions about the status of the above NPBTs chiefly concern their similarity to techniques covered by existing directives (mainly Directive 2001/18/EC). In particular a decision is expected as to whether or not these techniques are considered to generate GMOs under the relevant legal definition and whether they must be regulated as such or should be exempt from assessment.

Under current provisions, a product has GMO status when obtained by techniques including in particular **insertion of a new molecule of recombinant DNA**. The provisions cover products derived

¹³ Epigenetics describes the molecular mechanisms involved in controlling expression of a genetically encoded trait. The present memorandum discusses modifications produced by DNA methylation. Such DNA modifications are reversible, and, although they can be transmitted from one generation to the next, whether they are retained will depend on the environment. Other modifications of DNA-associated proteins are possible.

¹⁴ Longer-lasting expression is possible with genome integration by transgenesis or SDN-3 targeted integration. Non-permanent modification is again observed if transgenes are removed by segregation.

from techniques involving a modification that is deemed to be a **mutation**. It should be noted that products of mutagenesis are exempt from assessment owing to a history of safe use.

Moreover, the **targeting** capability of some of these genome modification techniques has been highlighted as a possible argument for easing assessment regulations.

The question of a modification's **transmission** and **heritability** is also important when considering the regulatory framework for products derived from these techniques. It turns on two issues: (1) Transient (or non-transmissible) presence versus heritability of the genetic modification itself (modification of somatic cells versus germ cells, since modification of somatic cells can also be transmitted by plant propagation); (2) Transient presence versus heritability of the epigenetic consequences of a genetic modification (epigenetic changes can be induced without stable insertion of genetic material in the genome; in the event of stable insertion, they may continue to exist after this material has been removed by segregation).

- One possible approach would be to consider whether or not the products (fruit, seed, fodder, etc.) contained transgenes. Thus the products would be studied separately from other parts of the plant that did not enter the marketing chain. This does not mean that these other parts would not be assessed, particularly if their genetic characteristics were covered by Directive 2001/18/EC, but the product, if not distinguishable from a similar product obtained by a technique not falling within the definition of GMOs, should not be subject to specific assessment.

- Another set of questions concerns the possibility of **detecting** products of a particular technique **by identifying** the technique used. If molecular detection technology is unable to tell the difference between the techniques used to obtain products, non-DNA **traceability** methods (technical or documentary traceability) could provide information if necessary.

As noted above, EU legislation is being debated against a background of continuously evolving genetic engineering techniques. One proposal is that regulation should be based on the characteristics of the products obtained rather than the techniques used to generate them. There is also the problem of assessment if one organism cannot be differentiated from another obtained by practices not subject to assessment.

The tables below, together with the subsequent comments and overview, provide information for the French competent authorities in preparation for discussions at the EU level.

<i>Techniques</i> <i>Questions</i>	SDN-1 (Site-specific mutation)	SDN-2 (Allele conversion)	SDN-3 (Sequence insertion)	ODM (Oligonucleotide-directed mutagenesis)
Detection of DNA modification¹⁵	Yes	Yes	Yes	Yes
Stable insertion of DNA	No	No	Yes	No
Identification of development method	No	No: natural variant. Possible: if modification is combined with a molecular signature ¹⁶ .	No: if there is a natural equivalent. Sometimes possible if combined with a molecular signature ¹⁸ .	No: usually. Possible: if modification is combined with a molecular signature ¹⁸ .
Possibility of development by a technique listed in Annex 1B of Directive 2001/18/EC	Yes	Yes	No, unless modification can occur naturally or be produced by mutagenesis.	Yes
Specific risk for a technique listed in Annex 1B	No ¹⁷	No ¹⁹	Possible for some sequences.	No ¹⁹
Field coexistence: detection	Yes, ¹⁸ and if phenotype and trait are not present in the growing area.	Yes ²⁰ , and if molecular signature and trait are not present in growing area.	Yes ²⁰ : typically.	Yes ²⁰ , and if phenotype and trait are not present in growing area.
Modification ascribed to a technique in supply chains	No	Possible only with molecular signature.	No, unless sequence exogenous to plant.	No. Possible only with molecular signature.
Perceived benefit of technique	Precision; faster pace of variety development.	Precision; faster pace of variety development.	Gene inserted precisely at site; faster pace of variety development.	Precision; faster pace of variety development.
Possible agronomic objectives	Gene knockout: phenotypic change.	Introducing a natural variation ¹⁹ of interest into an existing variety.	Adding an exogenous gene or modifying expression of an existing gene of interest. Multiple gene insertion.	Gene knockout: phenotypic change. Introducing a natural variation.

¹⁵ The identification of a genetic modification in an organism's genome does not indicate how it was produced.

¹⁶ A molecular signature would consist in inserting a predefined pattern of nucleotides unlikely to be found in nature. It would thus be possible to ascribe a mutation to a technique rather than just selection of a natural variant.

¹⁷ The product to be marketed will have undergone molecular characterisation.

¹⁸ Yes if the modification is transferred, which will depend on the plant's method of pollination.

¹⁹ Natural variation: use of the genetic variability of biodiversity, for example.

Techniques Questions	Non-GM scion on SDN-1, SDN-2 or ODM rootstock	Non-GM scion on SDN-3 rootstock or transgenesis	GM scion (SDN-1, SDN-2, SDN-3, ODM, cis- & intragenesis) on non-GM rootstock
Detection of DNA modification	Yes for rootstock. No for scion and fruit.	Yes for rootstock. No for scion and fruit.	Possible for scion. Refer to modification techniques (see table on previous page).
Stable insertion of recombinant DNA	No	Yes for rootstock.	Possible: SDN-3, cisgenesis and intragenesis.
Identification of development method	No for whole plant, except for rootstock with molecular signature.	Possible for rootstock ²⁰ . No for scion and fruit.	See table on previous page.
Possibility of development by a technique listed in Annex 1B of Directive 2001/18/EC	Yes	No, apart from some types of cisgenesis.	See table on previous page for each technique.
Specific risk for a technique listed in Annex 1B	No ²¹	Possible depending on sequence inserted.	See table on previous page for each technique.
Field coexistence: detection	Non-GM fruit and gametes.	Non-GM fruit and gametes.	See table on previous page for each technique.
Modification ascribed to a technique in supply chains	No	No for products derived from scion.	See table on previous page for each technique.
Perceived benefit of technique	Precision; quick pace of variety development.	Precision; quick pace of variety development.	Precision; quick pace of variety development.
Possible agronomic objectives	Gene knockout: phenotypic change. Introducing a natural variation.	Adding an exogenous gene or modifying expression of an existing gene of interest.	Modifying an existing gene or its expression or adding an exogenous gene.

²⁰ See SDN-3 column on previous page for specific detection problems.

²¹ See Footnote 19; it is here assumed that the product to be marketed will have been characterised in the laboratory.

Questions \ Techniques	RdDM (RNA-directed DNA methylation)	Agro-infiltration	Cisgenesis (introduction of DNA from a sexually compatible species)	Intragenesis (introduction of recombinant DNA from a sexually compatible species)
Detection of DNA modification	Yes: technically complex.	Yes	Yes	Yes
Stable insertion of recombinant DNA	Depending on method	No	Yes	Yes
Identification of development method	Yes: if transgenesis. No: RNA, CRISPR.	Yes, transient.	Yes: transgenesis or molecular signature. No: genetic modifications that could occur naturally.	Yes
Possibility of development by a technique listed in Annex 1B of Directive 2001/18/EC	Yes	No, but not relevant: mostly transient expression.	Possible in some cases.	No
Specific risk for a technique listed in Annex 1B	Depending on method	No: plant is destroyed for extraction.	Not relevant	Not relevant
Field coexistence: detection	Unstable heritability and varying contribution to gamete profile depending on plant.	Not relevant owing to contained use.	Transfer depending on plant's pollination method.	Transfer depending on plant's pollination method.
Modification ascribed to a technique in supply chains	No	No. Detection possible of random transgene fragments.	Yes.	Yes.
Perceived benefit of technique	Control of gene expression.	Transient high-level expression.	Rapid method of trait development.	Rapid method of trait development.
Possible agronomic objectives	Breeding plants expressing traits of interest.	Producing molecules of interest, including for pharmacology.	Adding an exogenous gene or modifying expression of an existing gene of interest.	Adding an exogenous gene or modifying expression of an existing gene of interest.

Table 1: Questions raised by NPBTs: technique by technique

General comments

The Scientific Committee wishes to point out that when a genetic modification is detected, this does not mean that the molecular mechanisms responsible for its presence in the genome can be determined with any certainty. Usually it is only possible to trace introduction of a (recombinant) sequence if it is constructed *in vitro* and exogenous to the parental genome. Furthermore, molecular techniques used for genetic modification are not necessarily associated with a biological risk.

The Scientific Committee notes that the technology is continuing to evolve²². Firms usually prefer to conduct a series of laboratory tests prior to marketing. In the case of targeted techniques, tests are designed in particular to check the specificity of the modification. Validation criteria prior to further development are molecular and phenotypic. Regulatory controls would be possible at this stage.

The Scientific Committee further observes that some selected traits will be associated with agronomic practices involving use of plant protection products. The fact that these traits are obtained using an NPBT will not affect the regulatory framework regarding use of these active substances.

Generally speaking, the genetic resources available in plant breeding will be a key factor in use of NPBTs. **It is therefore important to preserve genetic resources and the access to them under current arrangements.** Without prejudice to future decisions, existing systems such as Plant Variety Certificate (Plants breeders right), could continue to operate.

For gene therapy using SDN techniques, it is the ANSM²³, EMA²⁴ and CAT²⁵ that will assess the conditions in which they can be used.

Comments on Table 1

SDN-1 and ODM (Table 1): These techniques generate modifications and then products identical to those obtained by conventional mutagenesis. It will therefore be particularly difficult to tell how such organisms have been obtained and, more specifically, impossible to distinguish them with certainty from plants obtained by selection or cross-breeding. The table 1 shows that conventional cross-breeding or mutagenesis could produce the same plants from 'wild' genetic resources: NPBTs simply save time when creating a variety.

Similarly, as regards labelling, while a number of products obtained by different techniques are labelled for origin, the question of detection could be complex in the processing chain. Application of Annex 1B of Directive 2001/18/EC must therefore be adapted accordingly.

Thus, since the products obtained will be similar to others generated using techniques currently exempt from analysis, or even classified as non-GMOs, it would be logical for them not to be subject to GMO assessment.

The Scientific Committee here notes that a claim of property based on molecular detection alone will not be sufficient and could require elements of documentary traceability.

²² In the case of CRISPR/Cas9 recent papers suggests that off-target mutations are not detectable.

²³ French National Agency for Medicine and Health Product Safety.

²⁴ European Medicines Agency.

²⁵ Committee for Advanced Therapies (EMA).

SDN-2 (Table 1): The situation is identical to SDN-1 on all points, except that breeders could choose to introduce molecular signatures for traceability in order to support ownership claims. **This is an issue of ownership rather than a question of a risk entailing assessment.**

SDN-3 (Table 1): The gene or sequence introduced is easily identifiable if exogenous to the plant, for example, but more complex to distinguish if equivalent to a natural or induced gene duplication. For an exogenous gene, the most logical solution might be to use GMO assessment principles. There is no consensus on the concept of a ‘reliable’ insertion site characterised as such.

For SDN-3 used with cisgenesis, most cases would correspond to naturally occurring duplication and could come under the same provisions.

For the sake of clarity, one member of the Scientific Committee has wished the arguments for consideration of off-target mutations²⁶ to be stated. The following paragraph deals with the question of off-target mutations and their impact on the regulatory framework:

The Scientific Committee notes that off-target mutations are a particularly technical field that is undergoing substantial change and improvement. For example, the CRISPR/Cas9 system has evolved considerably since it first appeared (nickases, redefined guides and, more recently, proteins from other bacterial strains).

There are both phenotypic and molecular methods of selecting organisms, in laboratory or greenhouse conditions or in field trials, for subsequent development.

Off-target mutations can be identified by sequencing. **It should, however, be pointed out that with ever-improving technology, number of off target modifications below a certain threshold will not differ from number of natural sequence variations, and thus it will not be possible to tell them apart.**

The Scientific Committee therefore suggests that SDN-1, SDN-2 and ODM should be classified in the same way as mutagenesis (Annex 1B of Directive 2001/18/EC):

- Either these techniques are “precise” and their products are indistinguishable from natural variants or mutants obtained by mutagenesis after selection.
- Or else they are not precise, in which case, as for mutagenesis, the products will be crossed with conventional varieties to introgress the mutated gene. The Scientific Committee notes that the number of mutations to be selected will be much lower.
- As regards detection and identification of plant origin, off-target mutations, however many in number, cannot reliably be employed on their own to certify the type of technique used to obtain the plant.

Grafting (Non-GM scion on SDN-1, SDN-2 or ODM rootstock / Non-GM scion on SDN-3 rootstock / GM scion (SDN-1, SDN-2, SDN-3, ODM, cis- & intragenesis) on non-GM rootstock) (Table 1): The question of exchanges between scion and rootstock must be taken into consideration. At present it is accepted that the rootstock does not contribute to cell formation of the reproductive organs of the scion and therefore to the gametes and fruit derived from it.

The Scientific Committee stresses the relevance of differentiated assessment for scion and rootstock. Thus assessment, or exemption from assessment, based on molecular analysis will depend directly

²⁶ The fact sheets for each SDN technique explain off-target mutation and the methods of detecting it. The latter are mainly broad spectrum analysis techniques such as next-generation sequencing (NGS).

on the technique used to produce the GM component, since grafting will not alter any specific impacts on health or the environment.

The recommendations on the first page of Table 1 can be transposed to some of the combinations in this section.

Fruit and seed of non-GM plants derived from GM rootstock do not require specific environmental or health assessment; the rootstock will be assessed on the basis of its modification.

RdDM (Table 1): Epigenetic changes are observed in nature, generally as a result of adaptation to environmental changes. In such circumstances they are usually reversible. Reversion of modification could happen after transmission following a variable number of generations. Modification could be maintained **as long as environmental selection pressure is maintained**. RdDM modifications are intended to guide such adaptations, but their mechanisms are no different from those found in non-GM organisms.

If they contain no transgenes, plants with epigenetic modifications will not be subject to systematic assessment on the GMO model.

Agro-infiltration (Table 1): Agro-infiltration in the narrow sense used by the European Commission does not cover transformation of germ tissue (see fact sheet) and is not intended to produce GM offspring. The agrobacteria used are GMMs (genetically modified micro-organisms) and are therefore regulated as such.

If stable transformation of germ cells cannot be ruled out, they will not be selected for regeneration of GMOs.

Cisgenesis and intragenesis (Table 1): Specific molecular analysis is required for the question of cisgenesis and intragenesis: modifications that cannot be differentiated from those derived from an event that could be obtained by 'conventional' breeding should be classified in the same way as the latter. Here an assessment equivalent to the assessment for self-cloning of micro-organisms²⁷ might be suggested. Whether organisms would then come under GMO assessment arrangements would depend on the outcome of this analysis.

Negative segregants of genetic modifications (not included in table): In plant breeding, using negative segregation to remove a genetic modification event, of whatever origin (conventional cross-breeding, transgenesis, SDN-3, cisgenesis or intragenesis, agro-infiltration, etc.), is standard procedure. **After molecular confirmation that the modification has been removed**, the resulting plant should be exempt from risk assessment and could be considered to be a plant obtained by conventional breeding.

²⁷ The self-cloning referred to in Article D.531-2 of the French Environment Code consists in the removal of nucleic acid sequence from a cell of an organism, which may or may not be followed by reinsertion of all or part of that nucleic acid (or a synthetic equivalent), with or without prior enzymic or mechanical steps, into cells of the same species or into cells of phylogenetically closely related species which can exchange genetic material by natural physiological processes. This technique is considered not to give rise to genetic modification if it does not involve use of genetically modified organisms as recipient or parental organisms and if the resulting micro-organism is unlikely to cause disease to humans, animals or plants and is for contained use.

To ascertain whether a micro-organism could be regarded as the result of self-cloning, HCB would have to be consulted and would have to be sent a classification request. Only Class 1 recipient micro-organisms are concerned by self-cloning.

It should be noted that the techniques assessed may have complementary purposes within the same plant breeding strategy and can be combined. The table below gives some examples.

<i>Technique 1</i> <i>Technique 2</i>	<i>'Conventional'</i> <i>transgenesis</i>	<i>Agro-infiltration</i>	<i>Cisgenesis/</i> <i>Intragenesis</i>	<i>Negative</i> <i>segregants</i>
<i>SDN-1, SDN-2</i>	Not relevant	Yes, modification possible on plasmid carried by <i>Agrobacterium</i> , which remains a GMM ²⁸ owing to the transgene.	Not relevant	Yes, if genes needed for technique have been incorporated. Product classified as SDN-1/SDN-2.
<i>ODM</i>	Not relevant	Not relevant	Not relevant	Not relevant
<i>SDN-3</i>	Yes but targeting	Modification possible on plasmid carried by <i>Agrobacterium</i> , which remains a GMM ³⁰ owing to the transgene.	Organism's characteristics dependent on targeting and transgene.	Yes, if genes needed for technique have been incorporated. Product classified as SDN-3.
<i>RdDM</i>	If combined with negative segregants, see that case. If not, conventional assessment.	Not relevant	Not relevant	Possible

Table 2: Examples of NPBT combinations

4. Conclusions / Overview

Despite the range of situations described in this document, the Scientific Committee's work can be summed up as follows:

- In plant breeding, using negative segregation to remove a genetic modification event, of whatever origin (conventional cross-breeding, transgenesis, SDN-3, cisgenesis or intragenesis, agro-infiltration, etc.), is standard procedure. After molecular confirmation that the modification has been removed, the resulting plant should be exempt from risk assessment and could be considered to be a plant obtained by conventional breeding.
- Any technique that can produce a plant that is indistinguishable from another plant of the same species that could have been obtained by 'conventional cross-breeding' or selection of mutants (natural or induced) should not be subject to systematic analysis on the GMO model. This concerns SDN-1, SDN-2, ODM and negative segregants.

²⁸ GMM: Genetically modified micro-organism.

- Fruit and seed of non-GM plants derived from GM rootstock do not require specific environmental or health assessment; the rootstock will be assessed on the basis of its modification.
- If they contain no transgenes, plants with epigenetic modifications will not be subject to systematic assessment on the GMO model.
- Contained use of agro-infiltration, if no offspring are produced, does not generate GMOs²⁹.
- Some forms of cisgenesis/intragenesis could qualify, on a case-by-case basis and after examination of constructs, for exemption from assessment (as in the case of self-cloning of micro-organisms).

The HCB Scientific Committee further notes that the benefit of NPBTs is twofold. In terms of research and knowledge creation, SDN techniques are now a **key tool for laboratories**. These techniques offer access to previously unavailable data. In terms of agronomy, use of SDN techniques should mean that some modifications see a **rapid adjustment** in **market** conditions (**demand for varieties produced**) and in **environmental** conditions (**disease resistance, for example**).

Research on questions relating to **intellectual property** could be based on molecular and biological data and covered by specific legal studies. The HCB Scientific Committee emphasises that the impossibility of determining the origin of a genetic modification is a factor to be taken into consideration in terms of both intellectual property and traceability in the supply chain.

It should be noted that the questions considered here will be reviewed more extensively in a future contribution from HCB, when a wider range of modifications will be investigated.

²⁹ Open-field use of agro-infiltration is not considered here.