

Rencontres Agriculture & Innovation 2025

au salon international de l'agriculture

#AI2025

Promesses et limites des nouveaux outils de sélection végétale (NBT)

3 mars 2016 / de 10 h à 12 h



SIA2016

Leviers pour relever les défis de l'agriculture

- **Social**
 - Changement des habitudes alimentaires, reconnaissance du métier
- **Economique**
 - Accès à la surproduction, revenus justes, distribution des bénéfices
- **Pertes/gaspillage**
 - Transport, péremption, non-consommation
- **Agronomique**
 - Labour, traitements, rotation
- **Génétique (semences)**
 - Génétique classique
 - Sélection massale
 - Biotechnologies (*sensu lato*)
 - Sélection génomique
 - Nouvelles outils de sélection végétale ou NBT ("new plant breeding techniques")
 - OGM traditionnels



LETTER

doi:10.1038/nature13609

Producing more grain with lower environmental costs

Xiping Chen^{1*}, Zhenling Cui^{1*}, Mingsheng Fan¹, Peter Vitousek², Ming Zhao³, Wenqi Ma⁴, Zhenlin Wang⁵, Weijian Zhang⁶, Xiaoyuan Yan⁶, Jianchang Yang⁶, Xiping Deng⁶, Qiang Gao⁶, Qiang Zhang^{6*}, Shiwei Gao^{6*}, Jun Ren¹², Shiqing Li⁶, Youliang Ye¹³, Zhaohui Wang⁶, Jianliang Huang¹⁵, Qiyuan Tang¹⁶, Yixiang Sun¹⁷, Xiankong Peng¹⁸, Jiawang Zhang⁶, Mingrong He⁶, Yunji Zhu¹⁹, Jiquan Xiao⁶, Guifang Wang⁶, Liang Wu⁶, Ning An⁶, Liangquan Wu⁶, Lin Ma⁶, Weifeng Zhang⁶ & Fusuo Zhang⁶

586 | NATURE | VOL 514 | 23 OCTOBER 2014

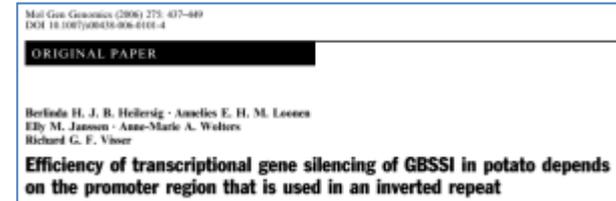
Définition des NBT ("New Plant Breeding Techniques")

- Les NBT sont
 - des techniques impliquant l'ingénierie cellulaire
 - des techniques qui ont attiré l'attention du législateur européen
 - 8 techniques mentionnées dans le rapport JRC de 2011
 - des techniques largement utilisées en R & D
- Les NBT ne sont pas toujours
 - des techniques nouvelles
 - des techniques à l'origine de produits commercialisés
- Les NBT définis en 2011 excluent
 - CRISPR/Cas9



8 nouveaux outils de sélection végétale (NBT)

- Cisgénèse et intragénèse
 - Introduction d'un gène **non-modifié** d'une espèce voisine
 - Pommier Gala résistant à la tavelure
- Mutagenèse par oligonucléotide (ODM)
 - Edition d'un gène à partir d'un oligonucléotide
 - Colza résistant à herbicide (demande de commercialisation de Cibus)
- Méthylation RNA-dépendent (RdDM)
 - Extinction de gènes par voie épigénétique
 - Pomme de terre avec amidon modifié (Amflora)
- Agro-infiltration
 - Expression transitoire
 - Production de molécules à valeur ajoutée (vaccins)



8 nouveaux outils de sélection végétale (NBT)

- Sélection inverse
 - Reconstitution des parents d'un hybride F1
 - Preuve de concept chez espèce modèle *Arabidopsis*
- Greffe sur porte-greffe transgénique
 - Greffon porte pollen et fruits non transgéniques
 - Concombre résistant à une maladie virale
- Biologie de synthèse
 - Introduction de nouvelles voies métaboliques
 - Caméline produisant huile de poisson (5 gènes)
- Nucléases ciblées (SDN = "site directed nuclease": zinc finger, méganucléase, TALEN, **CRISPR-Cas9**)
 - Inactivation ou édition de gène
 - Focus de la suite de l'exposé

Reverse breeding in *Arabidopsis thaliana* generates homozygous parental lines from a heterozygous plant

Erik Winkler^{1,2}, Kees van Dun^{3,7}, C Bastiaan de Snoo³, Cilia E C Leliveld³, Joot J B Keurentjes^{5,8}, Nazatul Shima Naharudin⁴, Maruthachalam Ravi⁵, Simon W L Chan^{5,6}, Hans de Jong¹ & Rob Dirks²

Transgenic Research 14: 81–93, 2005.

© Springer 2005

Transgenic cucumbers harboring the 54-kDa putative gene of *Cucumber fruit mottle mosaic tobamovirus* are highly resistant to viral infection and protect non-transgenic scions from soil infection

Amit Gal-On^{1,*}, Dalia Wolf², Yehezkel Antignus¹, Larisa Patlis², Ki Hyun Ryu³, Byoung Eun Min³, Malenia Pearlsman¹, Oded Lachman¹, Victor Gaba¹, Yongzeng Wang^{1,*,**}, Yoel Moshe Shibolet¹, Jee Yang¹ & Aaron Zelcer²

The Plant Journal (2014) 77, 198–208

doi: 10.1111/tpj.12378

Successful high-level accumulation of fish oil omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in a transgenic oilseed crop

Noemi Ruiz-Lopez, Richard P. Haslam, Johnathan A. Napier* and Olga Sayanova
Department of Biological Chemistry and Crop Protection, Rothamsted Research, Harpenden AL5 2JQ, UK

CRISPR/Cas9 et l'édition des génomes – une révolution?

- **CRISPR/Cas9 est**
 - une nucléase ciblée (SDN) parmi d'autres (zinc finger, méganucléase, TALEN)
 - plus prédictible et plus facile à mettre en œuvre que les autres SDN
 - à la portée de la majorité des laboratoires de biologie végétale
- **L'édition des génomes est**
 - le changement ciblé d'une ou plusieurs nucléotides du génome
 - monnaie courante chez des microorganismes (bactéries, levure) depuis des décennies
 - récent chez les végétaux

**CRISPR IS COMING TO AGRICULTURE –
WITH BIG IMPLICATIONS FOR FOOD,
FARMERS, CONSUMERS AND NATURE**

Gene editing offers dramatic advances in speed, scope and scale of genetic improvement. It also offers an opportunity for more nuanced GMO governance.

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS | BIOLOGY

Essay

Precision Genome Engineering and Agriculture: Opportunities and Regulatory Challenges

Daniel F. Voytas^{1*}, Caixia Gao^{2*}

1 Department of Genetics, Cell Biology, and Development and Center for Genome Engineering, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, United States of America, 2 State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

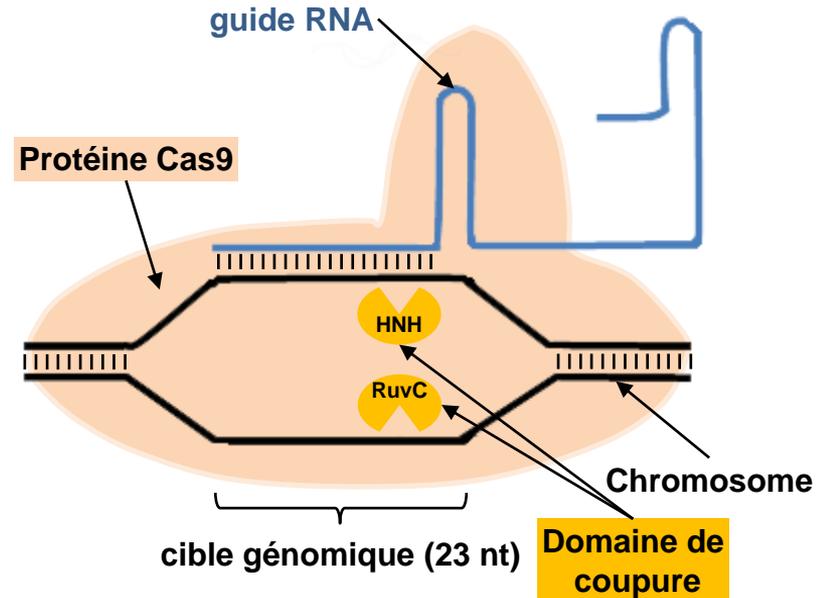
ABSTRACT

A new breed of edits

Genome editing allows much smaller changes to be made to DNA compared with conventional genetic engineering. In terms of agriculture, this might win over public and regulator opinion.

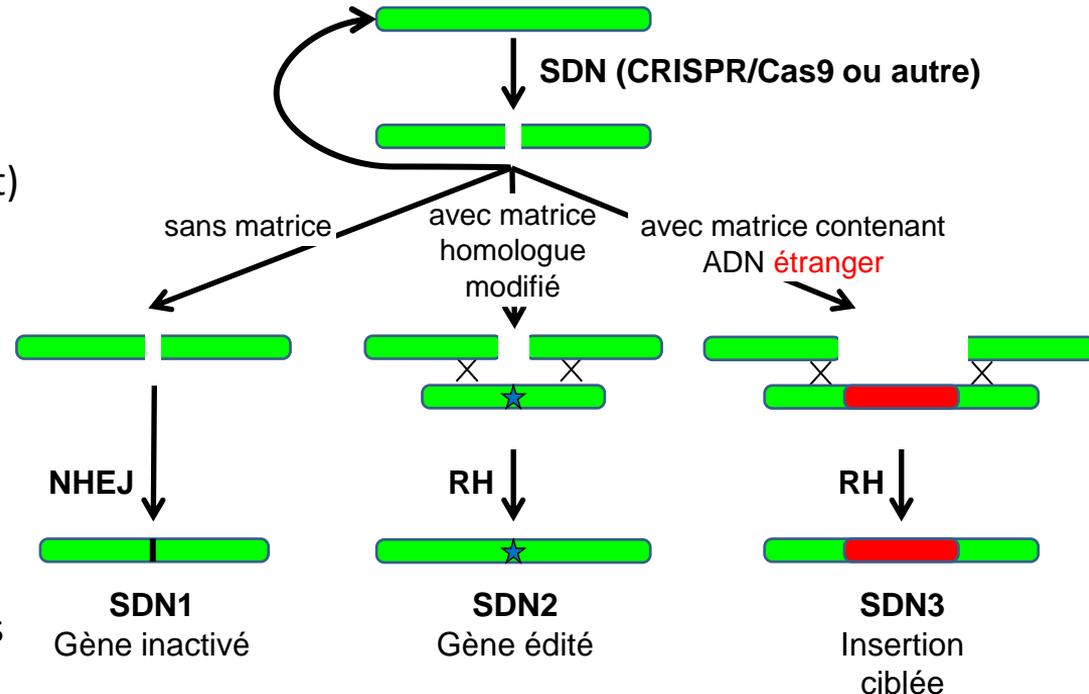
CRISPR/Cas9 – comment cela marche?

- **Coupure**
 - Formation d'un complexe entre la protéine Cas9 et un petit ARN conçu pour être homologue à un site unique du génome
 - Reconnaissance de la cible dans le génome
 - Coupure des deux brins de l'ADN chromosomique
- **Réparation**
 - Soudure de la cassure par les mécanismes naturels de réparation de la cellule végétale
 - 4 types de produits possibles



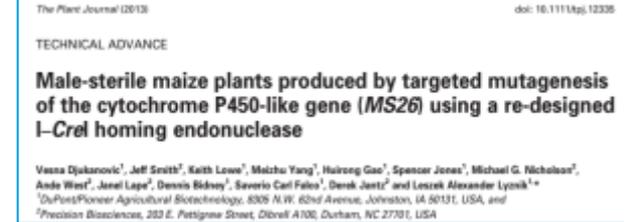
Réparation des cassures de SDN ("site directed nucleases")

- Réparation parfaite
- SDN1 (sans matrice)
 - Perte de fonction de gène (knockout)
- SDN2 (en présence d'un gène modifié)
 - Edition de gène à une ou plusieurs positions (knockin)
- SDN3 (en présence d'un ADN étranger entre extrémités homologues)
 - Insertion ciblée d'un transgène dans le génome (knockin)

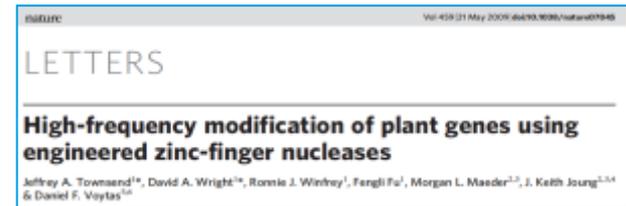
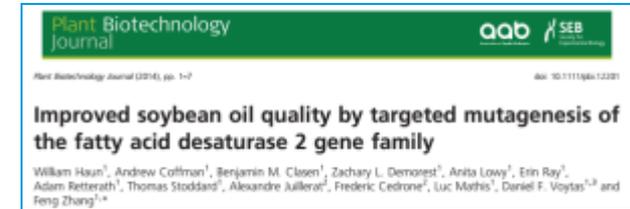


SDN1 (inactivation) – est-ce que cela marche?

- Stérilité mâle chez le maïs (méganucléase)
- Résistance à *Xanthomonas* chez le riz (TALEN)
- Résistance au mildiou chez le blé (TALEN, CRISPR)
- Huile plus riche en acide oléique chez le soja (TALEN)
- Projet GENIUS (TALEN et CRISPR)
 - modification de l'amidon chez la pomme de terre
 - gamètes diploïdes chez le maïs
 - architecture de la racine chez le riz

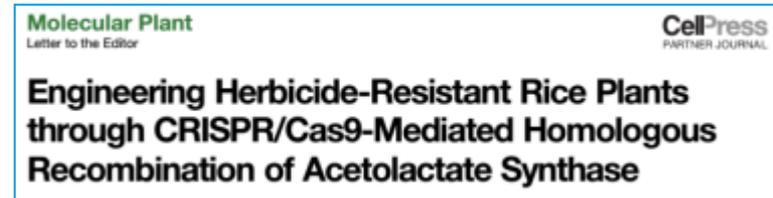
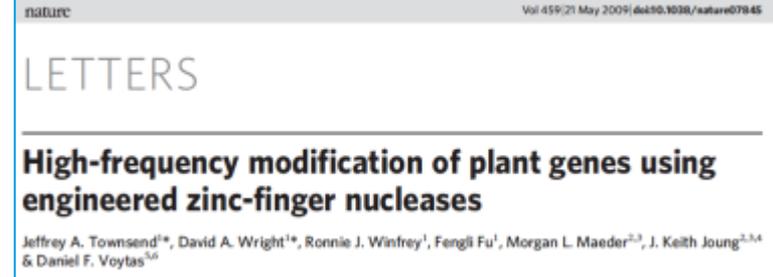


High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice



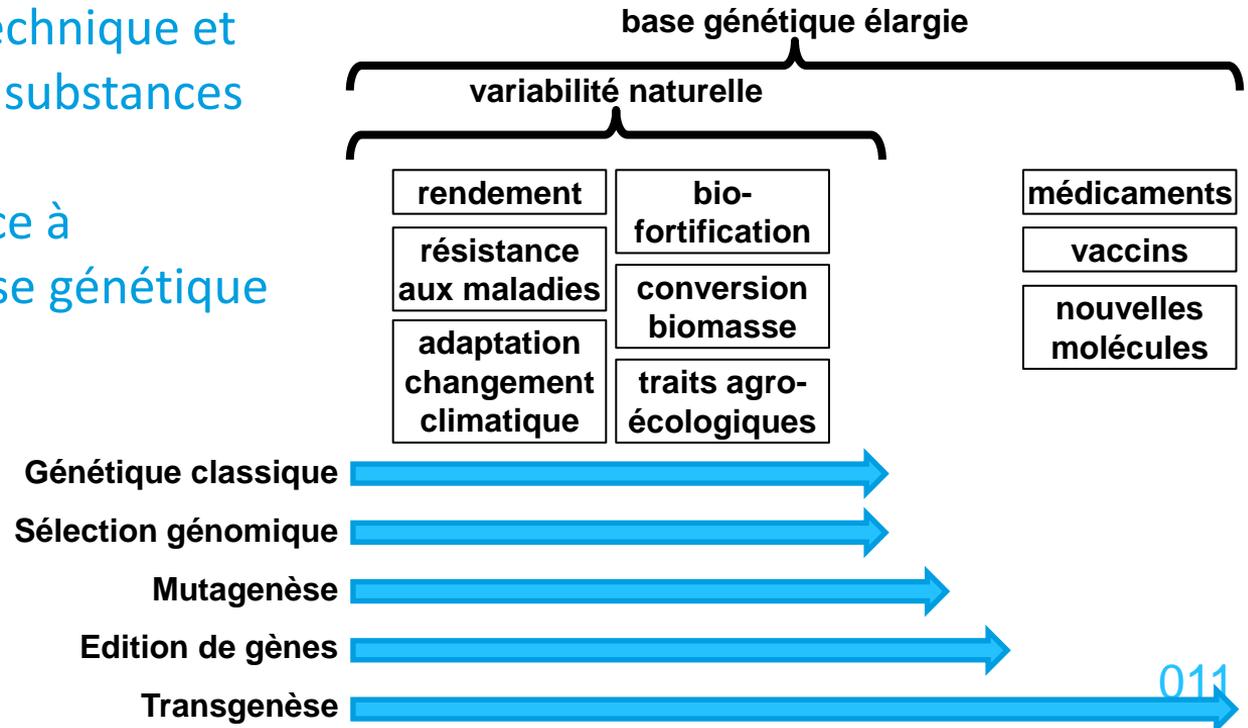
SDN2 (édition de gènes) – est-ce que cela marche?

- Résistance aux herbicides
chlorsulphuron et imazaquin chez le
tabac (**Nucléases à doigt de zinc**)
- Résistance à l'herbicide BS (bispyribac
sodium) chez le riz (**CRISPR**)
- Projet GENIUS (**TALEN** et **CRISPR**)
 - résistance au potyvirus chez la tomate
 - tolérance à la salinité chez le riz



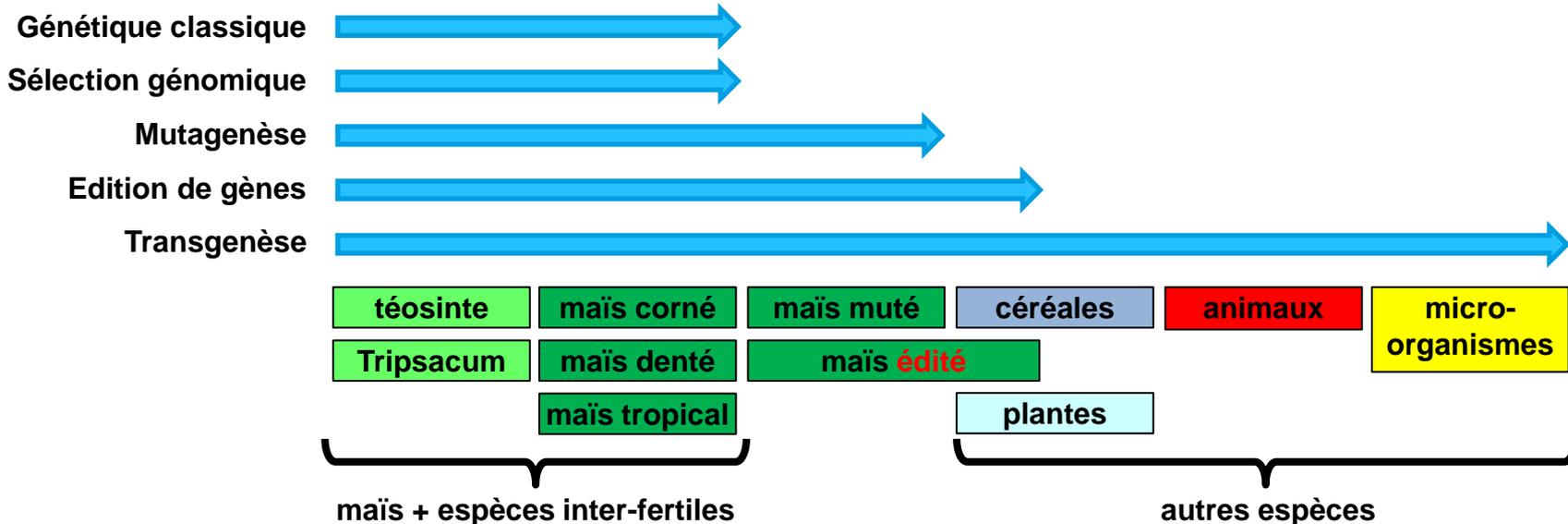
NBT – pour quels traits agronomiques?

- Absence de lien entre technique et trait agronomique (sauf substances étrangères)
- Sélection plus aisée grâce à l'élargissement de la base génétique

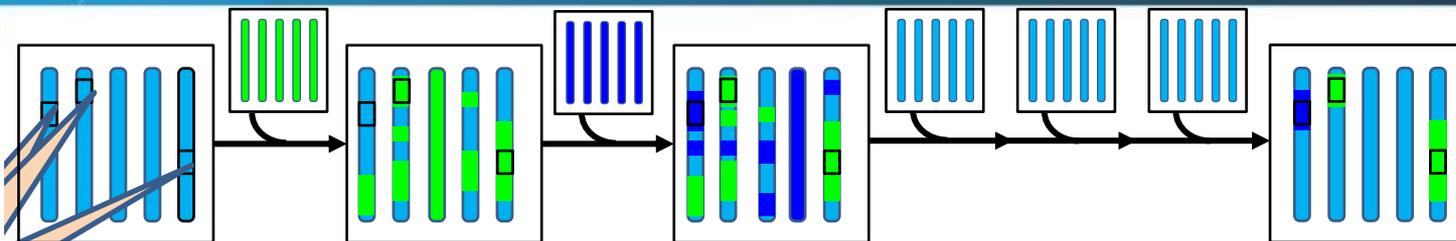


Edition de gènes - élargissement de la base génétique

- Modification de gènes existants pour obtenir
 - Gènes absents dans la variabilité naturelle
 - Gènes "optimisés"
 - Gènes inspirés d'autres espèces

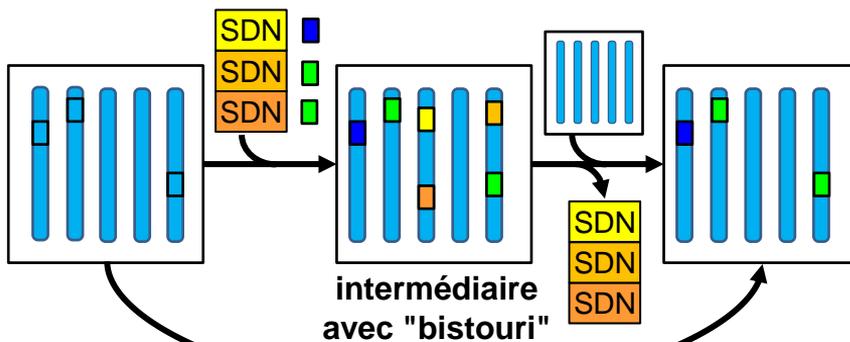


Etape
introgression
de la sélection
génomique



3 gènes impliqués dans
un trait à améliorer

Edition de
gènes



expression transitoire
SDN sous forme d'ARN ou protéine

- Edition vs sélection
génomique

- Vitesse
 - peu de générations
- Précision
 - introgression limitée au
gène d'intérêt
 - voisinage inchangé

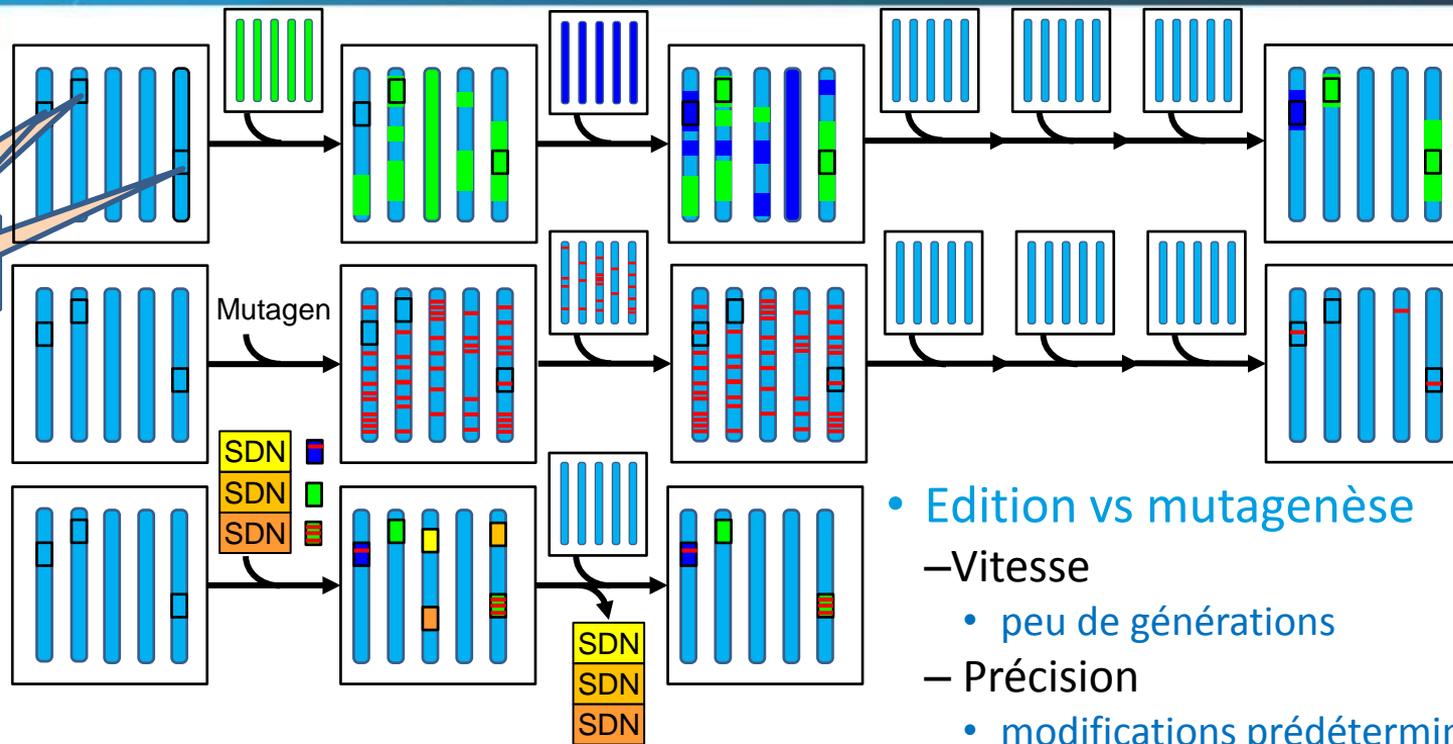


Sélection
génomique

3 gènes impliqués dans
un trait à améliorer

Mutagenèse

Edition de
gènes



• Edition vs mutagenèse

–Vitesse

- peu de générations

– Précision

- modifications prédéterminées
- modifications multiples
- peu ou pas de modifications ailleurs dans le génome



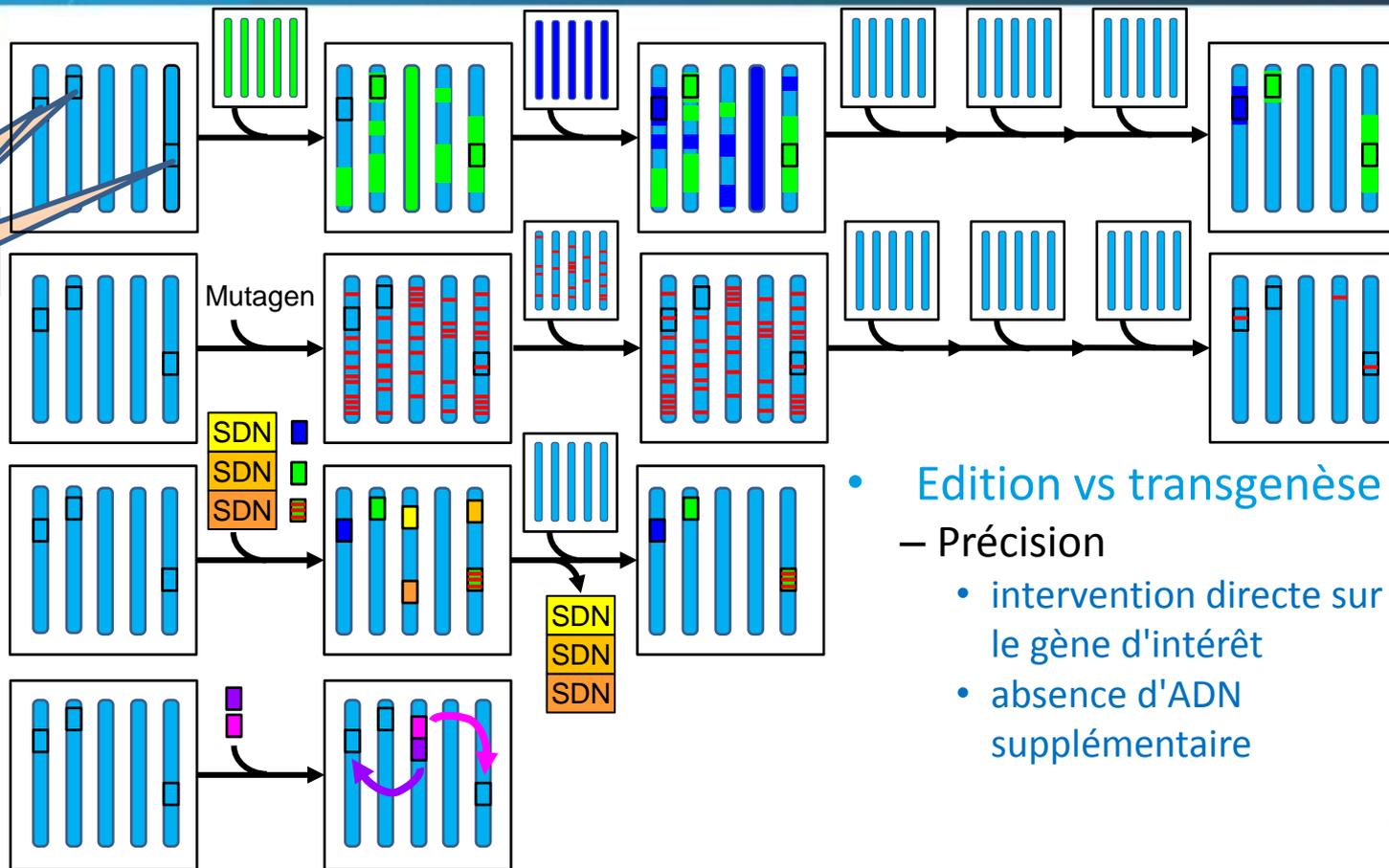
Sélection
génomique

3 gènes impliqués dans
un trait à améliorer

Mutagenèse

Edition de
gènes

Transgenèse



- **Edition vs transgenèse**
 - Précision
 - intervention directe sur le gène d'intérêt
 - absence d'ADN supplémentaire

Le dilemme du législateur

- Les mutants *psbS* (PHOTOSYSTEM II SUBUNIT S) d'*Arabidopsis thaliana* ont des statuts différents
 - Mutant obtenu par radiation OGM dérégulé
 - Mutant obtenu par mutagenèse chimique OGM dérégulé
 - Mutant obtenu par insertion d'ADN-T OGM
 - Mutant avec construction CRISPR/Cas9 OGM
 - Mutant obtenu par action de CRISPR/Cas9 ???
- Questions ouvertes
 - Evaluation du processus ou du produit?
 - Adéquation du cadre réglementaire?

The *Arabidopsis thaliana* *PsbS* mutant
The same mutant produced five times, but which ones are within the scope of the European GMO legislation?

What is the function of PsbS?
PsbS is a protein which is involved in photosynthetic light harvesting and has been characterized as a 'safety valve'. Plants that lack the protein show reduced biomass and seed production under natural conditions. Mutant plants that fully lack the protein or produce a dysfunctional protein have been obtained in different ways.

A. The radiation mutant
The first *PsbS* mutant was made by exposing *Arabidopsis* plants to fast neutrons. The fast neutrons generate damage to the DNA that is repaired by the cells own DNA-repair machinery. During this repair, the whole *PsbS* gene was deleted and *PsbS* is therefore not present in the plant. However changes in other genes may also have occurred following the radiation.

B. The chemically induced mutant
The second *PsbS* mutant was made by exposing *Arabidopsis* plants to the chemical mutagen EMS. One letter in the gene for *PsbS* was changed leading to a dysfunctional *PsbS* protein.

C. The T-DNA mutant
The third *PsbS* mutant was made by transferring so-called T-DNA from the soil bacterium *Agrobacterium tumefaciens* to *Arabidopsis* plants. The T-DNA has inserted into the *PsbS* gene leading to a disruption of the gene. The result is that the *PsbS* gene is no longer functional.

D. & E. The modern genome edited mutant
The most recent technology to generate *PsbS* mutants is the so-called CRISPR/Cas mediated genome editing. This CRISPR/Cas system generates two double strand breaks close to each other at predetermined locations in the *PsbS* gene. The DNA-repair machinery repairs the break, deleting the DNA between the breaks leading to a dysfunctional *PsbS* gene. The intermediate mutant that still contains the DNA for producing the CRISPR/Cas complex that generates the double strand break is called mutant D. The final mutant E is produced from mutant D after a round of spontaneous fertilization. One quarter of the offspring no longer contains the genes for the complex and these are selected a mutant E. They contain no foreign DNA and only differ from wild type *Arabidopsis* by a small deletion in the *PsbS* gene.

A GMO or not a GMO?
Mutants A and B are not within the scope of the European GMO legislation. Mutant C is, even though T-DNA sequences are shown to naturally occur in crops like tobacco and sweet potato, considered a GMO. But what about mutant D and E? Mutant D still contains foreign DNA and is therefore considered a GMO. Mutant E does not contain foreign DNA and only lacks a number of DNA base pairs in the *PsbS* gene. Does this removal of a few base pairs constitute a novel combination of genetic material? Probably not. When compared to the mutants A and B it would be logical to subject the genome edited mutant E to the requirements of the GMO legislation.

Conclusion

- **Limites: connaissances et technicité**
 - Connaissances préalables
 - Polymorphisme(s) "bénéfique(s)"
 - Mode d'action du gène
 - Connaissances chez une autre espèce
 - Maîtrise de l'ingénierie cellulaire de l'espèce d'intérêt
 - Plus faible fréquence du SDN2 (édition) par rapport au SDN1 (inactivation)
 - Incertitude sur la réglementation européenne
- **Promesses: vitesse et précision**
 - Action limitée au(x) gène(s) d'intérêt
 - Absence d'ADN supplémentaire
 - Editions multiples dans un gène
 - Editions simultanées dans plusieurs gènes
 - Elargissement réfléchi de la base génétique
 - Application à tout trait d'intérêt agronomique ou écologique

