

Modifications génétiques : à chaque étape, des effets non-intentionnels

Description

Une entreprise qui souhaite mettre sur le marché une variété génétiquement modifiée ne va pas modifier directement le génome d'une des variétés « élites » mais celui d'une variété plus commune. La modification obtenue sera ensuite réintroduite dans une variété commercialement intéressante. Mais pour modifier génétiquement une plante, quelle que soit la technique ou le matériel utilisé, des étapes en aval et en amont de celle de la modification sont nécessaires. Chacune de ces étapes, schématisées ici, induit des effets sur le génome, documentés scientifiquement. Et pour l'étape de modification génétique en elle-même, ces effets impliquent la recherche d'un (délicat) équilibre entre efficacité de modification et nécessité de réduire le nombre et la nature des effets hors-cible.

Inf'OGM présente de manière très schématisée le protocole théorique et une bibliographie scientifique qui documente les principaux effets sur le génome. Des mises à jour seront faites régulièrement.

Lexique : de quoi va-t-on parler ?

Ce lexique a pour objectif de guider le lecteur dans sa compréhension des étapes décrites. Les définitions données sont celles d'*Inf'OGM*.

Effets non intentionnels

C'est l'ensemble des impacts sur le génome liés à la mise en œuvre d'un protocole de modification génétique. Ces effets ont lieu à chacune des étapes du protocole.

Effets hors-cible

Les effets hors-cible sont les effets non intentionnels liés à l'étape de modification génétique en elle-même. Ils sont appelés ainsi car ils ont lieu ailleurs que sur l'endroit du génome théoriquement ciblé.

Mutations

Une mutation est couramment définie comme une modification de l'information génétique contenue dans un organisme. Les mutations sont héréditaires. Elles peuvent être « silencieuses », c'est-à-dire n'avoir aucune implication dans le métabolisme de l'organisme. Mais elles peuvent aussi affecter l'expression d'un ou plusieurs gènes, modifiant le métabolisme. Une même mutation peut même avoir des effets très différents selon le fond génétique et l'environnement.

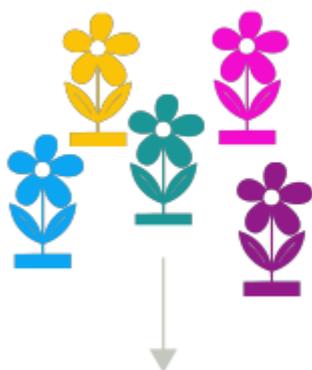
Épimutations

Les épimutations appartiennent à la famille des mutations affectant l'expression d'une séquence génétique mais qui ne sont pas dues à une modification de la séquence génétique elle-même. Elles peuvent par exemple être dues à un changement de la composition chimique de briques de base de l'ADN, les nucléotides.

Dans le schéma ci-dessous, les mutations sont représentées par des points rouges et les épimutations par des points oranges (ces effets non intentionnels étant schématisés, la proportion entre mutations et épimutations n'est pas représentative).

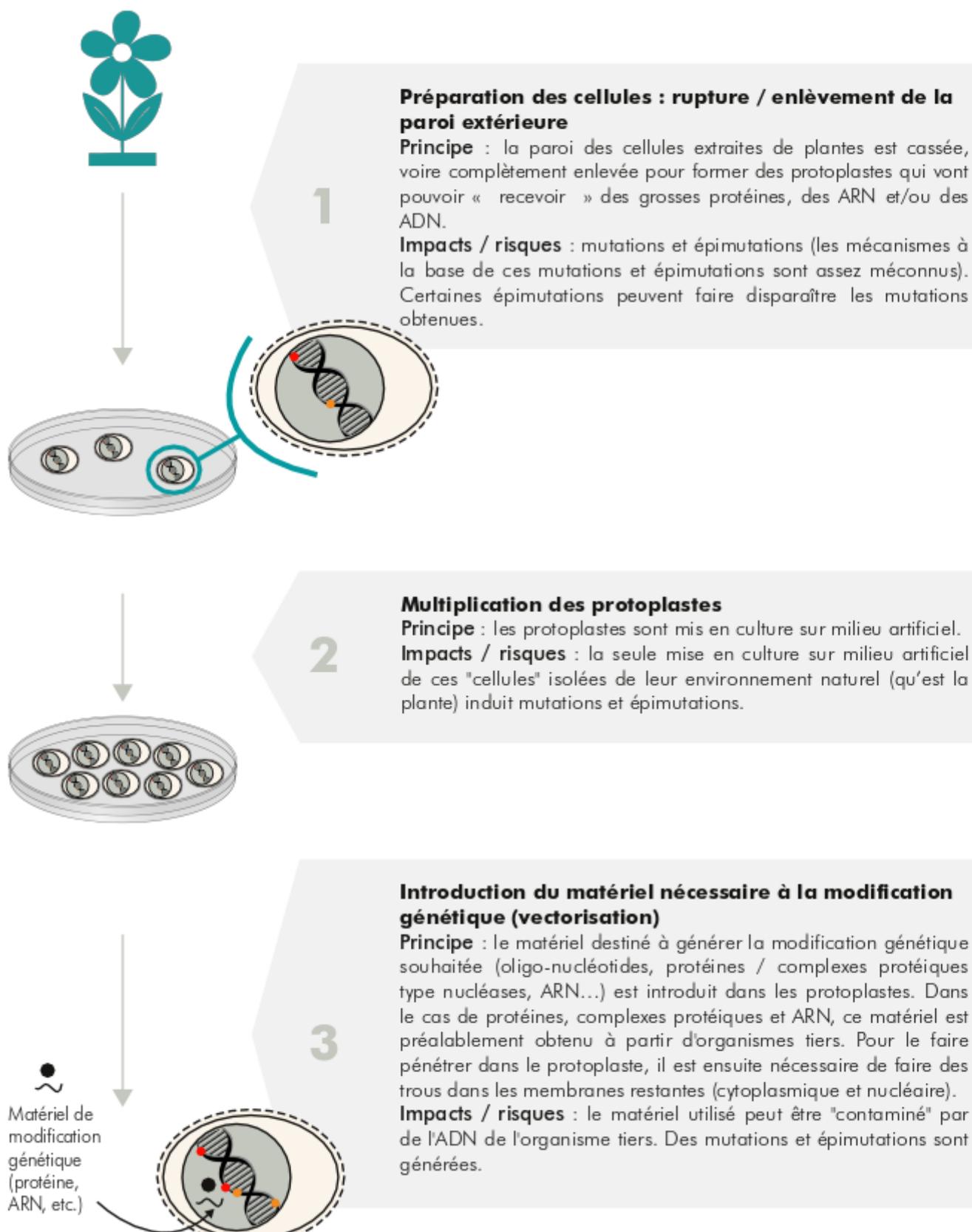
La modification génétique est représentée par un trait rouge le long de l'ADN.

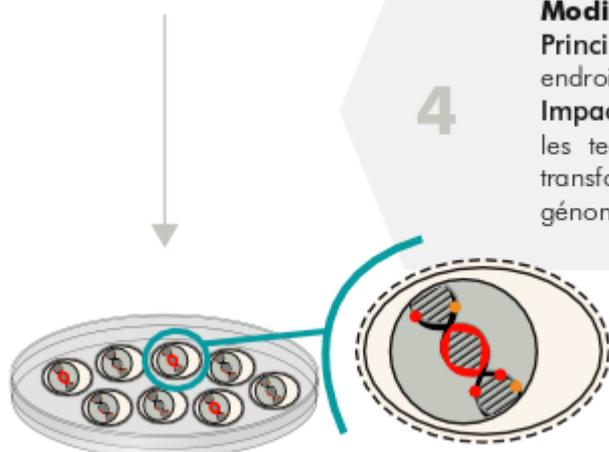
MODIFICATION GÉNÉTIQUE, QUELLES ÉTAPES POUR QUELS EFFETS NON-INTENTIONNELS / HORS-CIBLE ?



Choix d'une plante

Au sein d'une population de plantes (d'une population de différentes variétés ou de différentes espèces), les techniciens doivent choisir une plante qu'ils connaissent aussi bien que possible en tenant compte d'un très grand nombre de variations au niveau des parties codantes et régulatrices du génome. Ils doivent donc notamment séquencer les génomes de ces plantes, pour en choisir une, ce qui peut prendre plusieurs semaines, voire plusieurs mois.



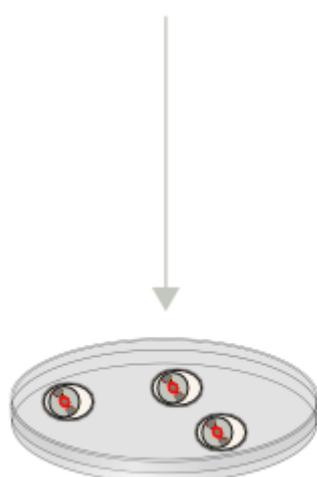


4

Modification génétique

Principe : le matériel induit une modification génétique dans un endroit aussi ciblé que possible.

Impacts / risques : outre les effets hors-cible non détaillés ici, les techniques ont une faible, voire très faible, efficacité de transformation. Peu de cellules vont effectivement voir leur génome modifié de manière ciblée.



5

Sélection des cellules par gènes marqueurs

Principe : les cellules modifiées sont sélectionnées en utilisant des marqueurs (gène de résistance à des antibiotiques ou à des herbicides, gène permettant la croissance de la cellule en présence d'une molécule habituellement toxique ou encore gène qui permet aux cellules d'utiliser une source de carbone normalement non métabolisable...) les différenciant de celles n'ayant pas été modifiées. Ces marqueurs sont ensuite « supprimés ».

Impacts / risques : techniques de suppression plus ou moins fiables et précises qui peuvent induire potentiellement des toxicités cellulaires et autres réarrangements chromosomiques, laisser des empreintes et produire des sites de recombinaisons (lieux d'échanges de séquence génétique entre deux brins d'ADN).

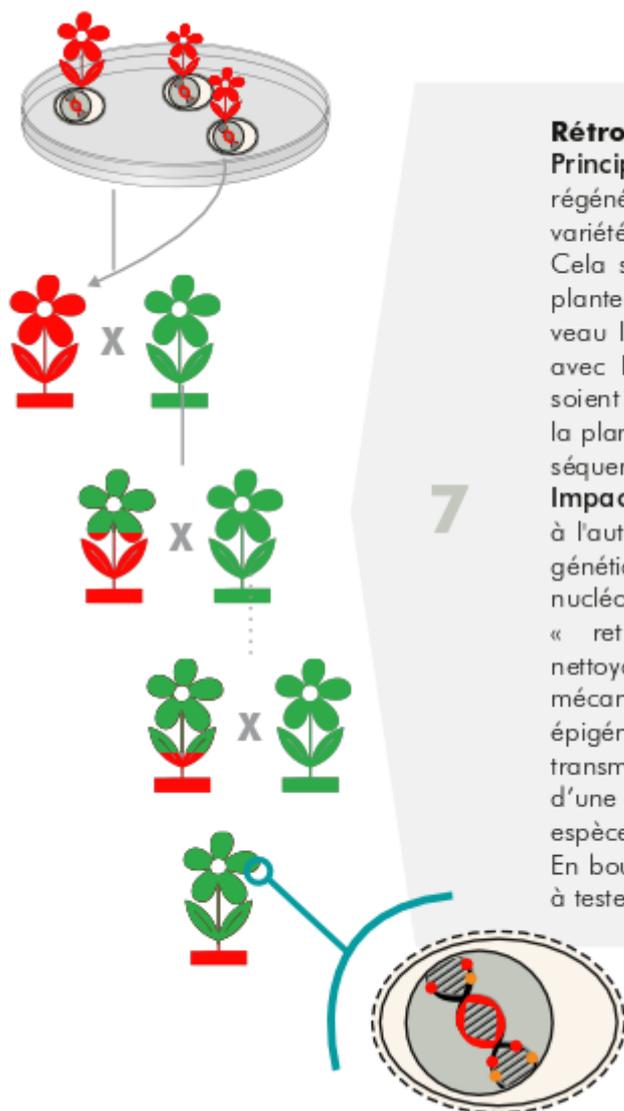


6

Régénération des plantes

Principe : à partir des cellules génétiquement modifiées sélectionnées, des plantes doivent être régénérées par culture cellulaire avec diverses hormones de synthèse.

Impacts / risques : mutations et épimutations avec réarrangements ou non de chromosomes.



Rétrocroisement

Principe : la plante génétiquement modifiée (GM) issue de la régénération doit maintenant être croisée avec une plante d'une variété élite pour introduire dans cette dernière la modification. Cela se fait par croisement : entre une plante modifiée et une plante « élite », puis entre les descendants obtenus avec à nouveau la plante élite initiale, puis entre les descendants obtenus avec la plante élite initiale... jusqu'à ce que ces descendants soient considérés statistiquement comme quasiment similaires à la plante élite. La différence est alors supposée n'être que la seule séquence modifiée.

Impacts / risques : la taille du génome peut varier d'une plante à l'autre. La part finale du génome venant de la plante modifiée génétiquement est d'environ 3 %, soit plus que quelques nucléotides ! Le rétrocroisement ne permet par ailleurs pas de « retirer » tous les effets non intentionnels présents. Car le nettoyage du génome par rétrocroisement est difficile du fait de mécanismes variés de transmissions héréditaires (régulation épigénétique, transmission non mendélienne, séquences d'ADN transmises en bloc, ordre des gènes sur le génome différent d'une variété à l'autre, forte variation du génome chez des espèces autogames comme le soja...).

En bout de course, on obtient plusieurs plantes (et non une seule) à tester en serres et aux champs et par séquençage.

Séquençage

Après le rétrocroisement, une vérification du génome de la plante obtenue est faite par séquençage pour contrôler l'absence d'effets non intentionnels, dont les hors-cible, dans la plante génétiquement modifiée à commercialiser.

Impacts / risques : outre que l'ADN puisse être abîmé lors de la préparation des échantillons, plusieurs « problèmes » découlent de la mise en œuvre, lecture et utilisation des résultats : différence de résultats selon les préparations de l'ADN, selon les appareils et les logiciels utilisés, les séquences de référence peuvent contenir des erreurs...



Malgré ces effets non intentionnels et les limites du séquençage, les entreprises considèrent que la plante génétiquement modifiée obtenue peut rentrer dans les circuits réglementaires de commercialisation.

Inf'OGM, septembre 2017.

Inf'OGM remercie Yves Bertheau, chercheur de l'Inra au Muséum national d'histoire naturelle, pour ses corrections, commentaires et suggestions.

Bibliographie scientifique relative aux différentes étapes

1 – Préparation des cellules : rupture / enlèvement de la paroi extérieure

- Image Meiotic transmission of epigenetic changes in the cell-division factor requirement of plant cells », Meins, F. *et al.*, (2003), *Development*, 130(25), 6201-6208 ;
- _ « Transformation-induced mutations in transgenic plants : analysis and biosafety implications », Wilson, A.K. *et al.*, (2006), *Biotechnol Genet Eng Rev*, 23(1), 209-238 ;
 - _ « Cell culture-induced gradual and frequent epigenetic reprogramming of invertedly repeated tobacco transgene epialleles », Krizova, K. *et al.*, (2009), *Plant Physiology*, 149(3), 1493-1504 ;
 - _ « Tissue culture-induced novel epialleles of a Myb transcription factor encoded by pericarp color1 in maize », Rhee, Y. *et al.*, (2010), *Genetics*, 186(3), 843-855 ;
 - _ « Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications », Neelakandan *et al.*, (2012), *Plant Cell Reports*, 31(4), 597-620 ;
 - _ « A whole-genome analysis of a transgenic rice seed-based edible vaccine against cedar pollen allergy », Kawakatsu, T. *et al.*, (2013), *DNA Research* 20, 623-631 ;
 - _ « Less is more : strategies to remove marker genes from transgenic plants », Yau, Y.Y. *et al.*, (2013), *Bmc Biotechnology*, 13 ;
 - _ « Extended metaAFLP approach in studies of tissue culture induced variation (TCIV) in triticale », Machczyńska, J. *et al.*, (2014), *Molecular Breeding*, 34(3), 845-854 ;
 - _ « Alternatives to antibiotic resistance marker genes for in vitro selection of genetically modified plants – Scientific developments, current use, operational access and biosafety considerations », Breyer, D. *et al.*, (2014), *Crit Rev Plant Sci*, 33, 286-330 ;
 - _ « Advances in plant breeding strategies : breeding, biotechnology and molecular tools », Al-Khayri,

J.M. *et al.*, (2016), *Springer International Publishing Switzerland*.

2 – Multiplication des protoplastes

- « Arabidopsis mesophyll protoplasts : a versatile cell system for transient gene expression analysis », Yoo, S.-D. *et al.*, (2007), *Nat. Protocols*, 2(7), 1565-1572 ;
- « Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of Arabidopsis leaves to prolonged mild osmotic stress », Skirycz, A. *et al.*, (2010), *Plant Physiology*, 152(1), 226-244 ;
- « An epigenetic view of plant cells cultured in vitro : somaclonal variation and beyond », Miguel, C. *et al.*, (2011), *Journal of Experimental Botany* 62, 3713-3725 ;
- « Stress induces plant somatic cells to acquire some features of stem cells accompanied by selective chromatin reorganization », Florentin, A. *et al.*, (2013), *Developmental Dynamics*, 242(10), 1121-1133 ;
- « Advances in plant breeding strategies : breeding, biotechnology and molecular tools », Al-Khayri, J.M. *et al.*, (2016), (*Springer International Publishing Switzerland*).

3 – Introduction du matériel nécessaire à la modification génétique (vectorisation)

- « Agrobacterium-mediated plant transformation : the biology behind the “gene-jockeying” tool », Gelvin, S.B. (2003), *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 16-37 ;
- « T-DNA-mediated transfer of Agrobacterium tumefaciens chromosomal DNA into plants », Ulker, B. *et al.*, (2008), *Nature Biotechnology* 26, 1015-1017 ;
- « Cell biology : delivering tough cargo into cells », Marx, V. (2016), *Nat Meth*, 13(1), 37-40 ;
- « Advancing crop transformation in the era of genome editing », Altpeter, F. *et al.*, (2016), *The Plant Cell* 28, 1510-1520.

4 – Modification génétique

- « Less is more : strategies to remove marker genes from transgenic plants », Yau, Y.Y. *et al.*, (2013), *BMC Biotechnology*.

Exemples pour Crispr/Cas9 :

- « Approaches to reduce CRISPR off-target effects for safer genome editing », Chapman, J.E. *et al.*, (2017), *Applied Biosafety*, 1535676017694148 ;
- « Genome editing system CRISPR/CAS9 and peculiarities of its application in monocots », Gerasimovaa, S.V. *et al.*, (2017), *Russian Journal of Plant Physiology* 64, 141-155.

5 – Sélection des cellules par gènes marqueurs et éventuelle excision ultérieure laissant des

traces / cicatrices visibles (ex : LoxP du système Cre-Lox)

- « Cre-lox-based method for generation of large deletions within the genomic magnetosome island of *Magnetospirillum gryphiswaldense* », Ullrich, S. *et al.*, (2010), *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2439-2444 ;
- « Suitability of non-lethal marker and marker-free systems for development of transgenic crop plants : present status and future prospects », Manimaran, P. *et al.*, (2011), *Biotechnology Advances* 29, 703-714 ;
- « Cre-loxP-mediated recombination : general principles and experimental considerations », McLellan, M.A. *et al.*, (2011), In *Current Protocols in Mouse Biology* (John Wiley & Sons, Inc.) ;
- « Less is more : strategies to remove marker genes from transgenic plants », Yau, Y.Y. *et al.*, (2013), *BMC Biotechnology* ;
- « A markerless protocol for genetic analysis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* », Cheng, Y.-A. *et al.*, (2014), *Journal of the Formosan Medical Association* 113, 114-123.

6 – Régénération des plantes

- « Regeneration in plants and animals : dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation ? », Sugimoto, K. *et al.*, (2011), *Trends in Cell Biology* 21, 212-218 ;
- « An epigenetic view of plant cells cultured in vitro : somaclonal variation and beyond », Miguel, C. *et al.*, (2011), *Journal of Experimental Botany* 62, 3713-3725 ;
- « Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications », Neelakandan, A.K. *et al.*, (2012), *Plant Cell Reports* 31, 597-620 ;
- « Less is more : strategies to remove marker genes from transgenic plants », Yau, Y.Y. *et al.*, (2013), *BMC Biotechnology* ;
- « Cell biology : delivering tough cargo into cells », Marx, V. (2016), *Nature Methods* 13, 37-40 ;
- « Advancing crop transformation in the era of genome editing », Altpeter, F. *et al.*, (2016), *The Plant Cell* 28, 1510-1520 ;
- « Plant-genome hackers seek better ways to produce customized crops », Ledford, H. (2016), *Nature* 539, 16-17.

7 – Rétrocroisement

- « Quantitative trait locus mapping can benefit from segregation distortion », Xu, S. (2008), *Genetics*, 180(4), 2201-2208 ;
- « Inherited variation at the epigenetic level : paramutation from the plant to the mouse », Cuzin, F. *et al.*

, (2008), *Current Opinion in Genetics & Development* 18, 193-196 ;

_ « Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement », Moose, S.P. (2008), *Plant Physiology* 147, 969-977 ;

_ « The composition and origins of genomic variation among individuals of the soybean reference cultivar Williams 82 », Haun, W.J. *et al.*, (2011), *Plant Physiology* 155, 645-655 ;

_ « Distorsions de ségrégation et amélioration génétique des plantes (synthèse bibliographique) », Diouf, F.B.H. *et al.*, (2012), *Biotechnologie Agronomie Société Et Environnement*, 16(4), 499-508 ;

_ « Genetic map construction and detection of genetic loci underlying segregation distortion in an intraspecific cross of *Populus deltoides* », Zhou, W *et al.*, (2015), *PLoS ONE*, 10(5), e0126077 ;

_ « Advancing crop transformation in the era of genome editing », Altpeter, F. *et al.*, (2016), *The Plant Cell* 28, 1510-1520 ;

_ « Draft assembly of Elite inbred line PH207 provides insights into genomic and transcriptome diversity in maize », Hirsch, C.N. *et al.*, (2016), *The Plant Cell* 28, 2700-2714 ;

_ « Unlocking a key to maize's amazing success », Pennisi, E. (2017), *Science* 357, 240-240 ;

_ « A natural tandem array alleviates epigenetic repression of IPA1 and leads to superior yielding rice », Zhang, L. *et al.*, (2017), *Nat Commun* 8, 14789 ;

_ « Transcriptomic analysis of short-fruit 1 (sf1) reveals new insights into the variation of fruit-related traits in *Cucumis sativus* », Wang, L. *et al.*, (2017), *Scientific reports* 7, 2950 ;

_ « Promoting transcription over long distances », Catarino, R.R. *et al.*, (2017), *Nat Genet* 49, 972-973 ;

_ « Genome-wide characterization of mammalian promoters with distal enhancer functions », Dao, L.T.M. *et al.*, (2017), *Nat Genet* 49, 1073-1081 ;

_ « A tiling-deletion-based genetic screen for cis-regulatory element identification in mammalian cells », Diao, Y. *et al.*, (2017), *Nat Meth* 14, 629-635 ;

_ « Rapid cloning of genes in hexaploid wheat using cultivar-specific long-range chromosome assembly », Thind, A.K. *et al.*, (2017), *Nat Biotech advance online publication* ;

_ « MLPA-based analysis of copy number variation in plant populations », Samelak-Czajka, A. *et al.*, (2017), *Frontiers in Plant Science* 8.

Séquençage

_ « Theoretical analysis of mutation hotspots and their DNA sequence context specificity », Rogozin, I.B. *et al.*, (2003), *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 544, 65-85 ;

_ « Applications of next-generation sequencing. Sequencing technologies – the next generation »,

-
- Metzker, M.L. (2010), *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31-46 ;
- _ « Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis », Laird, P.W. (2010), *Nature Reviews Genetics* 11, 191-203 ;
 - _ « Performance comparison of whole-genome sequencing platforms », Lam, H.Y.K. *et al.*, (2012), *Nat Biotech* 30, 78-82 ;
 - _ « Next-generation sequencing platforms », Mardis, E.R. (2013), *Annual Review of Analytical Chemistry*, 6(1), 287-303 ;
 - _ « Next-generation sequence assembly : four stages of data processing and computational challenges », El-Metwally, S. *et al.*, (2013), *PLoS Comput Biol* 9, e1003345 ;
 - _ « Sequence assembly demystified », Nagarajan, N. *et al.*, (2013), *Nat Rev Genet* 14, 157-167 ;
 - _ « Low concordance of multiple variant-calling pipelines : practical implications for exome and genome sequencing », O'Rawe, J. *et al.*, (2013), *Genome Medicine* 5, 1-18 ;
 - _ « Next-generation sequence assembly : four stages of data processing and computational challenges », El-Metwally, S. *et al.*, (2013), *PLoS Comput Biol* 9, e1003345 ;
 - _ « Rapid evaluation and quality control of next generation sequencing data with FaQCs », Lo, C.-C. *et al.*, (2014), *BMC Bioinformatics* 15, 1-8 ;
 - _ « Next generation sequencing technology : Advances and applications », Buermans, H.P.J. *et al.*, (2014), *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*, 1842(10), 1932-1941 ;
 - _ « Systematic comparison of variant calling pipelines using gold standard personal exome variants », Hwang, S. *et al.*, (2015), *Scientific reports* 5, 17875 ;
 - _ « Improving the quality of genome, protein sequence, and taxonomy databases : a prerequisite for microbiome meta-omics 2.0 », Pible, O. *et al.*, (2015), *Proteomics* 15, 3418-3423 ;
 - _ « Sequencing technologies and tools for short tandem repeat variation detection », Cao, M.D. *et al.*, (2014), *Briefings in Bioinformatics*, (2015), Vol16, Issue 2, 193–204 ;
 - _ « Systematic comparison of variant calling pipelines using gold standard personal exome variants », Hwang, S., *et al.*, (2015), *Scientific reports* 5, 17875 ;
 - _ « Open chromatin reveals the functional maize genome », Rodgers-Melnick, E. *et al.*, (2016), *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, E3177-E3184 ;
 - _ « Evolutionary patterns of genic DNA methylation vary across land plants », Takuno, S. *et al.*, (2016), *Nature Plants* 2, 15222 ;
 - _ « Droplet barcoding for massively parallel single-molecule deep sequencing », Lan, F. *et al.*, (2016), *Nat Comm*
-

7 ;

- « Rapid cloning of genes in hexaploid wheat using cultivar-specific long-range chromosome assembly », Thind, A.K. *et al.*, (2017), *Nat Biotech advance online publication* ;

- « DNA damage is a pervasive cause of sequencing errors, directly confounding variant identification », Chen, L. *et al.*, (2017), *Science* 355, 752-756 ;

- « Genetics : DNA variants or DNA damage ? », Nawy, T. (2017), *Nat Meth* 14, 341-341.

date créée

23 Déc 2018