



**HAL**  
open science

## Caractérisation de quelques inserts d'OGM commerciaux

Cecile C. Collonnier, Yves Bertheau

► **To cite this version:**

Cecile C. Collonnier, Yves Bertheau. Caractérisation de quelques inserts d'OGM commerciaux. Rapport d'Activité - Commission du Génie Biomoléculaire, 2004, 01, pp.50-61. hal-02671140

**HAL Id: hal-02671140**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02671140>**

Submitted on 31 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# VARIATION DE LA SÉQUENCE DES TRANSGÈNES VÉGÉTAUX

## DNA RECOMBINATION IN PLANTS: THE (IN)STABILITY OF (TRANS)GENES

**BARBARA HOHN**  
FMI, BASEL, SWITZERLAND

*My presentation will be concerned with the (in)stability of genes and transgenes, in particular, with mutation, transposition and recombination of endogenous genes in plants. I will also refer to some of our studies on the stability of the plant genome under environmental stress conditions.*

frequency of reversion was different, which means that this cannot be done with an endogenous gene.

### II. Transposition

In the natural system in place, the DS element, which cannot transpose by itself, has inserted into a gene that provides colour coloration, cross-seeded with a plant that contains an active element that is able to produce the transposers that can act on the DS element. Excision events occur and we find colour interceptors on individual plants.

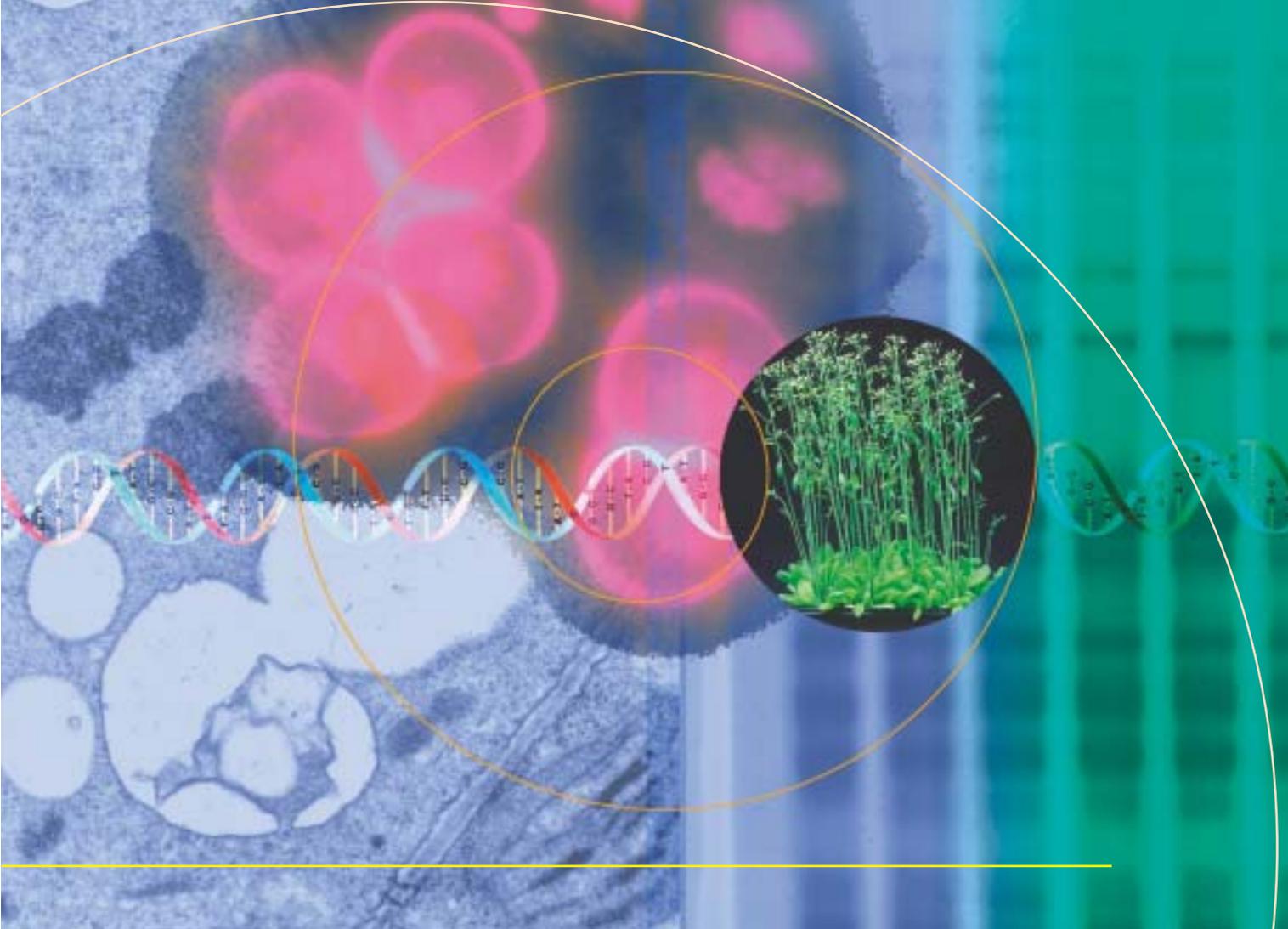
This system can be transposed into a transgenic system, as published by Carolias Dean's group a number of years ago. In this case, the AC element was inserted between the promoter and the structural gene. Each green spot represents an individual transposition in which the original gene-promoter combination has been restored.

New like elements have been known for quite some time. However, they very frequently package whole genes within their containment of inverted repeats. These genes were picked up in an unknown mechanism, allowing them to transpose from one place to another. From a negative perspective, this has been seen as being another mechanism of genome instability. From a positive perspective, this has been seen as being another mechanism of genome evolution, as every kind of fluctuation in the genome is necessary for development.

### I. Mutation

In order to analyse mutation in plants, we have established a transgenic system in the laboratory, which allows us to move from genes to transgenes. We were interested in finding out where, and with what frequency, mutations would take place. We therefore introduced mutations in certain genes so that stock colours would be introduced. We then looked at reversion events, which were expected to be visible as blue spots. We did indeed find blue spots on plants, although the frequency was usually much lower.

The following mutations have been introduced into the beta-glucuronidase gene, which interrupted the reading frame. This was done in five different positions of the gene. We analysed a number of independent transgenic plants containing these interrupted transgenes for the frequency of reversion. The frequencies of reversion were in the order of 0.1, 2 and 60 times  $10^{-8}$ , which was slightly higher than we had expected. In the thousands of transgenic plant lines that were analysed the



### III. Recombination

I will now be presenting somatic homologous recombination between two genes concerned with chlorophyll synthesis. We were interested in studying homologous recombination in plants but did not want to depend on endogenous systems. We therefore created an artificial system, interrupting the gene coding for beta-glucuronidase, so that duplicated regions would persist, either in direct or indirect orientations. We are very pleased with this image, the first to show blue spots all over the plant.

We analysed many different plant lines in which DNA had integrated in its normal random fashion. We found that the distribution of recombination events was varied. Recombination events were seen in all tissue analysed. We analysed single-copy insertion genes, and found that recombination events – in a similar way to the experiments analysing mutation – in a transgene locus depended on where in the plant genome this transgene has integrated. These studies cannot be carried out with endogenous genes. We do not know what this position effect is due to. It could be due to gene activity in the general area.

### IV. Environmental Studies

I will now present a number of environmental studies in which we tested different abiotic and biotic stresses on the level of recombination.

#### 1. RADIOACTIVE CONTAMINATION

We initially tested lab conditions in which we used UV, MMS or sodium chloride in order to test whether the plant lines we had created were sensitive to treatments that were known to be mutagenic. In the next stage, we analysed these recombination plants in areas close to Chernobyl. In certain controlled areas, plants were placed in small plots. They were not allowed to flower, and recombination was then tested in the laboratory. In parallel, plants were sown in soil obtained from these different areas.

Ten years after the Chernobyl accident, quite a lot of contamination is still to be seen, which is not surprising given the half life time of the radioactive compounds.



In terms of the experimental outcomes, recombination rates have been plotted for plants that were planted in the field or the laboratory. Recombination was seen to increase, which was expected. It then decreases, at a greater level in the field than in the laboratory. This indicates that active radiation is probably higher in the field than in the laboratory. The decrease may be due to alternative repair activities. Areas of very low levels of contamination – areas to which people were allowed to return – were still in a rather sensitive grade, as measured by the transgene monitoring systems.

## 2. HEAVY METAL POLLUTION

We know of many areas in the world that are affected by heavy metal pollution either due to natural or artificial situations. Different heavy metals were found to be active in our system, both in recombination and in mutation.

## 3. UV-B RADIATION

We wanted to see if UV-B had an effect on recombination in these plants. The experiments were carried out in a UV-B simulated chamber in Munich. In all cases, recombination increased with UV-B levels but to a different extent. This indicates that recombination is influenced by UV-B all over the genome, but to different degrees in different parts of the genome.

It may be of interest to see what will happen in the next generation. As we are concerned with somatic tissue, there is a chance that mutation or recombination will be transmitted to the next generation. We found that after different doses of UV-B, the recovery of fully recombined plants increased, although the numbers are relatively small.

## 4. PATHOGEN ATTACK

We also analysed DNA stability or instability as a function of pathogen attack. This is something that plants have to endure in nature, and the issue was whether pathogens have an effect on the level of plant selection and on the level of mutation rates. We tested three methods of pathogen attack: chemical, mutation, and pathogens per se. The experimental results were as follows. BTH increases recombination levels. It can be considered that it is useful for plants to have a general increased rate of mutation, or a general increased rate of repair. There could also be a specific influence of recombination on resistance genes, as it is

known that pathogen-resistant genes are present in clusters. It is possible that recombination between these clusters can be used by the plant to create new resistance genes. Such events have been found in nature.

However, it is very difficult to study recombination in resistance genes, using resistance as a marker, although experiments are being continued in this direction.

## 5. VIRUS INFECTIONS

Finally, we wanted to see whether a plant that experiences a virus infection will send a signal from the leaf of infection to other parts of the plant. Whatever recombination might mean for the plant, it could be advantageous to have the possibility of transmitting the notion that it has been attacked. The experiment consisted in infecting a tobacco leaf, and analysing whether another leaf experiences an increase in homologous recombination. It was found that the virus was not yet visible in the test leaf in 8 hours. However, in 36 hours, the tested leaf was infected by the virus. In terms of recombination, in the tested leaf that did not see the virus after 8 hours, recombination had already increased. In 24 hours, the virus could still not be seen in terms of symptoms, but recombination had increased. This indicates that there is a systemic signal that moves from leaf to leaf, and induces recombination in the upper leaves.

We could go one step further and analyse whether this leaf, which now has a signal in it, could be grafted to another plant that also contains transgenes, and whether recombination would therefore be increased. The results show that this is the case, but recombination was only enhanced in tobacco plants that do not have an active N gene (virus resistance gene). In plants containing an active N gene there is no increase in recombination.

## V. Conclusion

There is instability in plant genes, on the level of mutation, on the level of transposition, and on the level of homologous recombination. There is instability on the same levels in transgenes, although we cannot compare this quantitatively.



## QUESTIONS DANS LA SALLE

### de la salle

Did you check the number of mutations in the progeny of infected plants ?

### Barbara HOHN

Given that the mutation rate is so low, we did not look for mutants and we analysed the next generation only in terms of recombination. We did not consider the recombination rate per se. Rather, we analysed how many plants were fully recombined. We are also in the process of analysing recombination in the next generation of plants that had experienced radiation in the previous generation.

### de la salle

My question referred to UV-B treated plants.

### Barbara HOHN

UV-B was not tested in this particular case, which tested a plant elicitor that elicits a plant resistance response .

### de la salle

Have you attempted to detect inter-chromosomal recombination ?

### Barbara HOHN

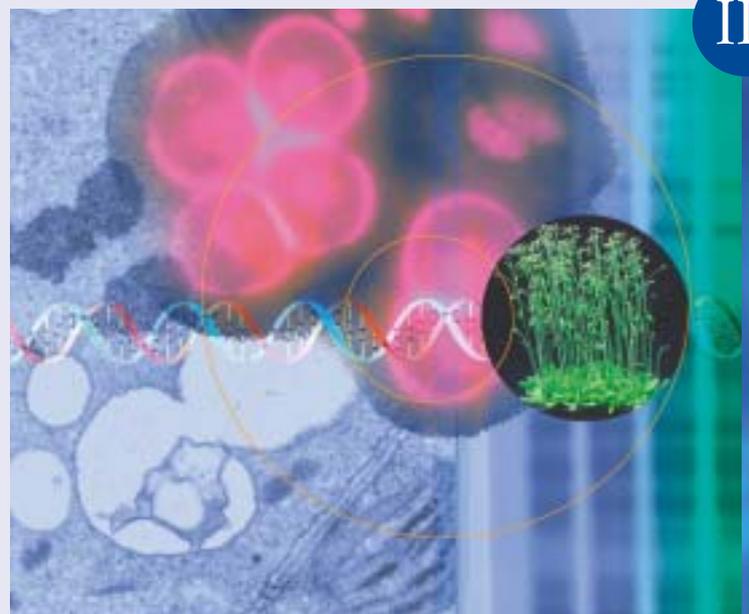
We have a construct in which a fully recombined gene would only be produced if there is recombination between two chromosomes. We found recombination there as well, some of which probably results from pop-out and reintegration and some of which is probably genuine inter-chromosomal recombination.

### de la salle

Have you checked whether you can see ?

### Barbara HOHN

We are not yet able to analyse this because the two chromosomes that recombine are the same ones, and there are no outside markers.



# CARACTÉRISATION DE QUELQUES INSERTS D'OGM COMMERCIAUX

CÉCILE COLLONNIER ET YVES BERTHEAU  
PRÉSENTÉ PAR MME CÉCILE COLLONNIER  
INRA VERSAILLES

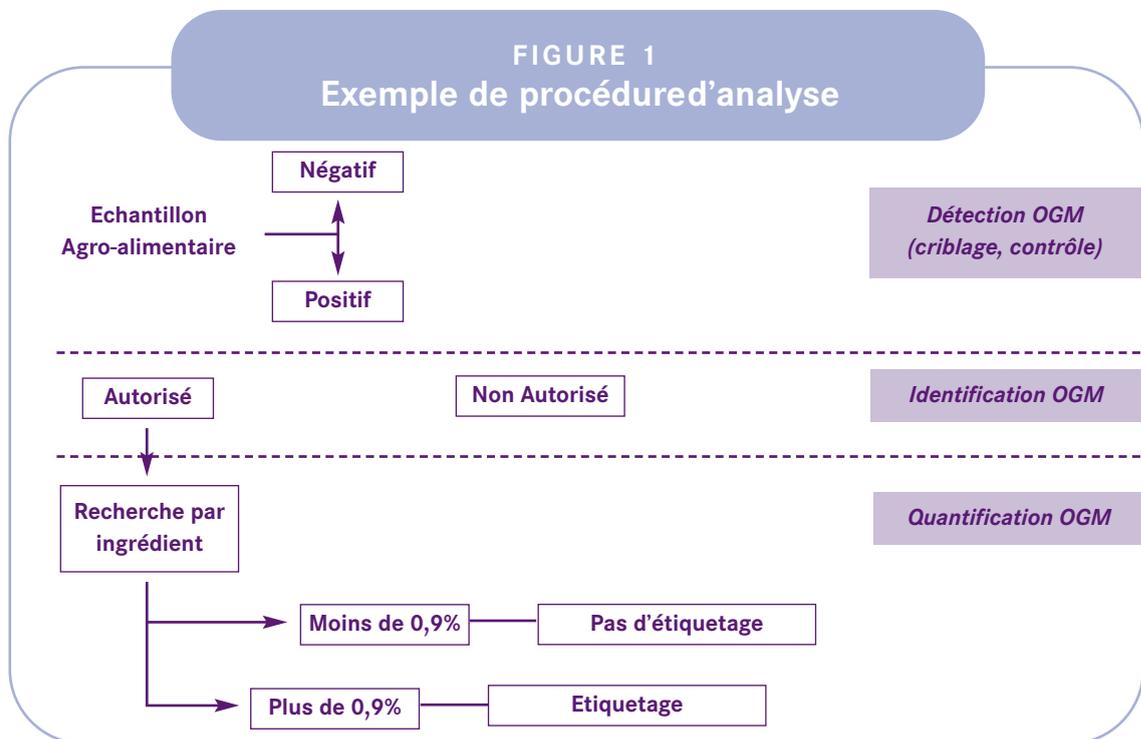
## I. Activités du laboratoire MDO

Le laboratoire MDO (Méthodologies de la Détection des OGM) est chargé d'apporter un appui aux laboratoires de contrôle et de réaliser des expertises pour les pouvoirs publics français. Il est impliqué dans les comités de normalisation (AFNOR, ISO...) et coordonne le réseau des laboratoires de détection d'OGM en France, en partenariat avec le réseau européen des laboratoires de détection d'OGM.

Ses activités de recherche sont focalisées sur le développement de méthodes de détection des OGM selon diverses stratégies et avec diverses cibles. Il développe des tests visant à détecter des OGM (criblage, construit spécifique, bordure), des gènes de référence d'espèces végétales ou la présence d'organismes donneurs d'éléments génétiques, pour éliminer les faux positifs.

### 1. EXEMPLE DE PROCÉDURE D'ANALYSE (FIGURE 1)

Tous ces tests sont utilisés dans le cadre de procédures d'analyse des OGM sur des échantillons agroalimentaires. Les tests de criblage et de contrôle sont utilisés lors de la phase de détection préliminaire, qui permet de suspecter la présence d'un OGM et de déterminer s'il faut aller plus loin dans la recherche d'OGM. Les tests de type « construit spécifique » et « événement spécifique » servent à l'identification des OGM, pour déterminer en particulier s'ils sont ou non autorisés. Enfin, les tests de type « événement spécifique » combinés à ceux portant sur les gènes de référence d'espèces végétales servent à quantifier les OGM, et à déterminer, selon la réglementation en vigueur, si un étiquetage spécifique est nécessaire.



## 2. CIBLES POTENTIELLES DE DÉTECTION

Les méthodes de détection des OGM développées par MDO sont essentiellement basées sur la PCR. Nos cibles diffèrent selon le type de test. Pour le criblage, nous utilisons des amorces qui hybrident des séquences d'éléments génétiques couramment utilisés dans les OGM (P35S, Tnos, nptII...). Pour les tests de type « construit spécifique », nous utilisons des amorces qui s'hybrident à la jonction des éléments génétiques au sein des inserts. Enfin, pour les tests de type « événement spécifique », nous positionnons les amorces au niveau des fragments de jonction, en 5' ou en 3', entre l'insert et l'ADN génomique végétal.

## 3. MÉTHODES UTILISÉES CHEZ MDO

Les méthodes utilisées pour la détection d'OGM connus et inconnus commencent chez MDO par une phase de caractérisation des inserts et des fragments de bordure pour la définition des amorces PCR. La PCR peut ensuite être suivie d'une hybridation sur des puces à ADN. Nos stratégies sont multiples. Parmi celles-ci, on peut notamment citer :

- ◆ la PCR simple (qualitative ou quantitative, simplex ou mutliplex...);
- ◆ la PCR consensus suivie d'hybridation sur puces à ADN;
- ◆ la PCR quantitative différentielle (cette méthode en cours de développement, pourrait être utilisée pour détecter des OGM inconnus ou non déclarés). Elle est basée sur une comparaison des quantités d'ADN de diverses cibles). Si le nombre de copies total d'ADN d'OGM détectés dans un échantillon (à l'aide de tests événements spécifiques) diffère significativement du nombre de quantités de molécules cibles de criblage (OGM + organismes donneurs), on peut alors fortement suspecter la présence d'OGM « inconnus » dans l'échantillon.
- ◆ l'approche matricielle, vise à établir une procédure structurée, avec des arbres de décision si nécessaire, au moyen de tests de criblage de manière à détecter le maximum d'OGM en réalisant le moins de tests PCR possible et à fournir une matrice, un « pattern » d'amplification et/ou d'hybridation par OGM à comparer avec celle d'un échantillon en analyse, qui permette de suspecter la présence d'OGM « inconnus ».

## 4. UTILISATION DE DONNÉES PUBLIQUES

Pour définir les amorces PCR nécessaires au développement de méthodes accessibles à tous les opérateurs économiques, le laboratoire MDO, comme

tout laboratoire public ou privé de développement de méthodes, utilise uniquement les données publiques décrivant les OGM commercialisés présentes dans :

- ◆ les parties rendues publiques des dossiers déposés lors des demandes d'autorisation de culture et de commercialisation de chaque événement OGM, qui comportent une description plus ou moins détaillée des inserts ;
- ◆ les brevets protégeant les technologies utilisées pour la construction des OGM, qui décrivent les vecteurs et les cassettes autorisés.

Ces données sont rassemblées par des organismes tels que le BATS (Center for Biosafety and Sustainability) ou AgBios.

## 5. CARACTÉRISATION DES INSERTS

Avant la publication du règlement 1829/2003 qui stipule que chaque notifiant doit fournir une méthode de détection pour chaque nouvel OGM déposé, il fallait procéder à un séquençage et à une annotation précise de l'insert pour :

- ◆ déterminer la séquence des fragments de bordure lors du développement de tests « événement spécifique » ;
- ◆ élucider les problèmes d'amplification sur la séquence « connue » de l'insert (absence d'amplification ou amplification de fragments n'ayant pas la taille et ou la séquence attendue).

## 6. PROGRAMMES DE RECHERCHE EUROPÉENS

Les résultats présentés dans la suite de cet exposé ont été obtenus par les laboratoires partenaires de deux programmes européens de recherche du FP5 :

### ◆ QPCRGMOFOOD

Ce programme était dédié au développement de tests QRT-PCR (fragments de bordure et espèces végétales) destinés à permettre de quantifier les OGM dans le cadre réglementaire.

### ◆ QPCRGMOCHIP

Ce programme était consacré au développement de tests PCR consensus utilisables sur une puce à ADN destinée à la détection et l'identification d'OGM connus et à la détection d'OGM inconnus (approche matricielle).

Les résultats présentés sont issus de ces programmes.

L'approche expérimentale choisie pour obtenir des tests dans le cadre de ces programmes reposait sur une amplification de l'insert décrit dans les données publiques (définition des amorces à partir des éléments génétiques connus), puis sur un séquençage des fragments de bordure (marche sur le chromosome, en commençant, par exemple, dans le premier promoteur et dans le dernier terminateur de l'insert décrit). En cas de problème d'amplification de l'insert, cette approche prévoyait un séquençage de la cassette par marche sur le génome à partir des fragments de jonction, en utilisant éventuellement les séquences connues de certaines des éléments génétiques rencontrés pour accélérer la progression.

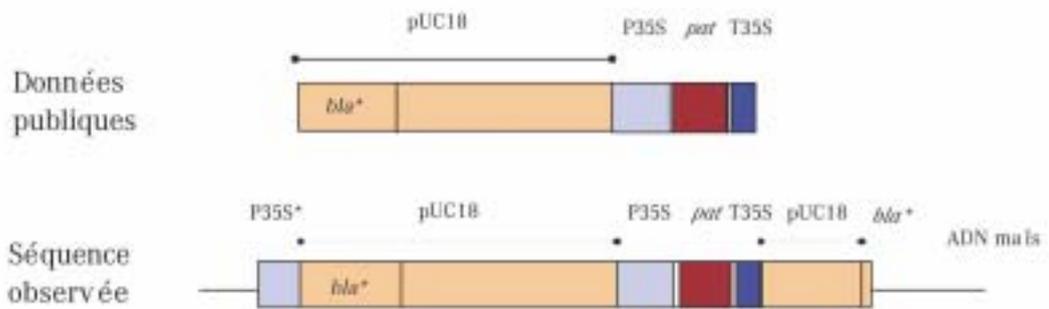
## II. Résultats de la caractérisation de quelques inserts commerciaux étudiés dans le cadre de ces programmes

### 1. MAÏS T25 - LIBERTYLINK™ (BAYER CROP SCIENCE) (FIGURE 2)

Ce maïs tolérant à l'herbicide glufosinate a été obtenu par transformation de protoplastes à l'aide de PEG. Par rapport à l'insert décrit dans les données publiques, nous avons trouvé un second P35S tronqué à l'extrémité 5' de l'insert, ainsi qu'un peu de plasmide pUC en 3'. Concernant le site d'intégration, nous avons constaté que cet insert se trouvait dans une séquence présentant des homologies avec le rétrotransposon Huck.

Ces résultats sont sous presse dans le journal *European food research technology*, dans un article rédigé en collaboration avec l'équipe du centre de recherches européen de Bayer CropScience.

**FIGURE 2**  
Tolérance à l'herbicide glufosinate,  
Transformation Peg



➔ **Observations :** Second **PS35S tronqué en 5'** (+ pUC en 3')  
**Site d'intégration :** **Retrotransposon Huck**

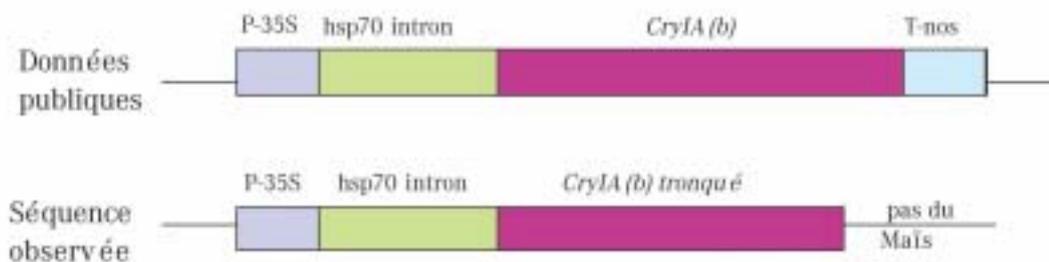
( Collonnier et al. (2004) Eur. Food Res. Tech. (In press) )

## 2. MAÏS MON810 – YIELDGARD™ (MONSANTO) (FIGURE 3)

Ce maïs qui présente une résistance aux insectes a été obtenu par bombardement. Par rapport aux données publiques, plusieurs laboratoires avaient observé une délétion du T-nos de l'insert, mais certains résultats mettent cependant en évidence de courtes séquences du T-nos dans le génome. Le site d'intégration en 5' présente une homologie avec la séquence LTR du cluster de l'alpha-zéine. En revanche, il n'y a pas d'homologie avec cette séquence en 3'.

Ces derniers résultats ont été publiés par deux équipes partenaires des programmes, l'une espagnole, l'autre norvégienne.

FIGURE 3  
Résistance aux insectes, Bombardement



➔ **Observations :** **délétion** du T-nos de l'insert (mais partie Tnos détectable dans le génome), Tnos tronqué ?  
**délétion** d'une partie du *CryIA (b)*

**Site d'intégration :** Homologie en 5' avec la séquence LTR du cluster de l'alpha-zéine  
**pas d'homologie en 3' avec cette séquence**

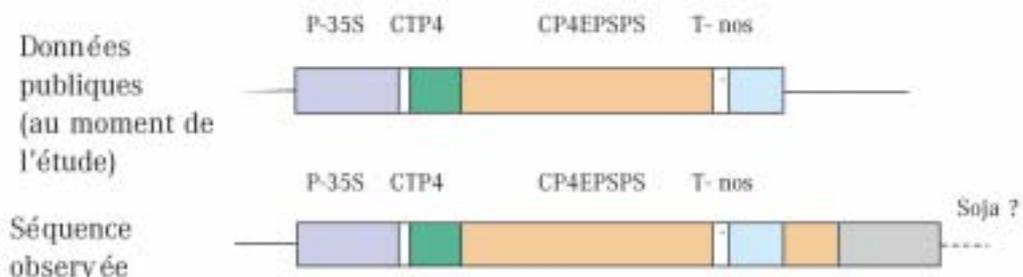
( Hernandez et al. (2003) TransgenicRec. 12 : 179 - 189 ;  
Holck et al. (2002) Eur. Food Res. Tech. 214 : 449 - 453 )

**3. SOJA GTS 40-3-2 (MONSANTO) (FIGURE 4)**

Ce soja tolérant à l'herbicide glyphosate (Roundup Ready™) a été obtenu par bombardement. Outre la cassette décrite dans les données publiques, l'équipe de M. Marc De Loose a observé, lors de travaux sur un fragment de bordure, une séquence de 245 pb homologue à CP4 EPSPS et une séquence inconnue de 534 pb. Le site d'intégration ne présentait pas d'homologie de continuité entre les deux fragments de jonction.

Ces résultats ont été publiés dans le journal *European food research technology*. Depuis, Monsanto a mis son dossier à jour en décrivant la séquence inconnue.

**FIGURE 4**  
**Tolérance à l'herbicide glyphosate**  
**(Roundup Ready™), Bombardement**



**➔ Observations :** en 3' une séquence de 245 pb homologue à CP4 EPSPS et une séquence inconnue de 534 pb  
**Site d'intégration :** pas d'homologie entre les 2 fragments de jonction

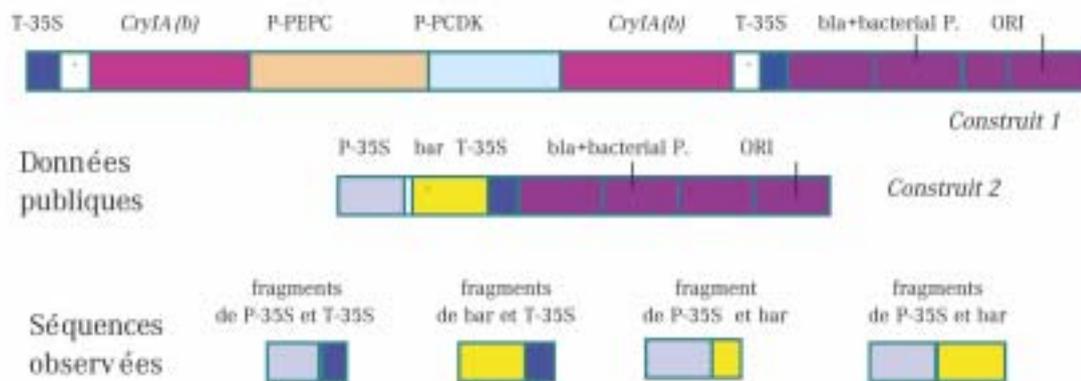
( Windels et al. (2001) Eur.Food Res. Technol. 213 : 107 - 112 )  
 ( dossier Monsanto mis à jour en fév.2002, décrivant la séquence inconnue)

#### 4. MAÏS BT176 (SYNGENTA) (FIGURE 5)

Ce maïs, obtenu par bombardement, présente une tolérance au glufosinate, une stérilité mâle et une résistance aux insectes. Nous ne l'avons que partiellement étudié. Les données publiques décrivent deux construits, le premier comportant deux cassettes et le second, un fragment d'ADN plasmidique et une cassette simple. Nous n'avons travaillé que sur le deuxième et avons détecté quatre types de fragments, mais ces résultats sont difficiles à interpréter. L'existence d'un overlap entre les séquences de P35S et T35S, dans le génome du virus et sans doute conservée – mais non documentée dans les données publiques – dans l'insert de l'OGM, pourrait expliquer, selon les conditions de PCR, les résultats qui sinon feraient penser à une délétion.

Nous n'avons pas encore d'informations sur le site d'intégration et les travaux de l'INRA de Versailles et du TEPRAL de Strasbourg n'ont pas été publiés.

FIGURE 5  
Tolérance au glufosinate, stérilité mâle, résistance aux insectes - Bombardement



➔ **Observations :** 4 fragments détectés - interprétation difficile ( overlap de P35S-T35S )

**Site d'intégration :** -

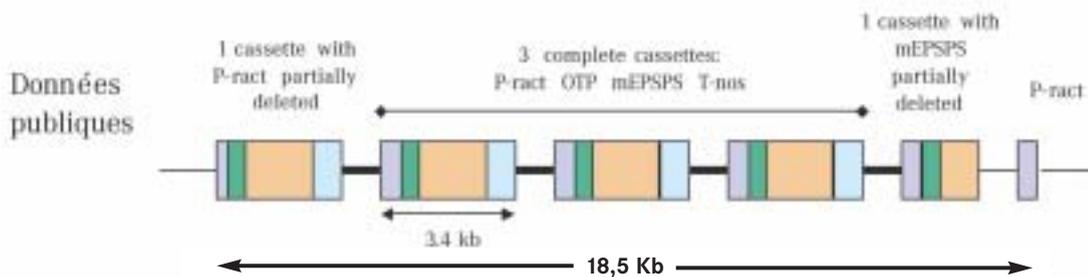
( Unpublished data : INRA MDO, versailles, France ; TREPAL, Strasbourg, France )



## 6. MAÏS GA21 (MONSANTO) (FIGURE 7)

Ce maïs, obtenu par bombardement, est tolérant au glyphosate. Les études ont confirmé la présence des différents éléments génétiques de la cassette décrite dans les données publiques et ont montré une jonction similaire entre chaque cassette. Ces observations sont donc en adéquation avec les éléments publiquement disponibles. Le site d'intégration présente des homologies avec le rétrotransposon PREM2. Ces résultats ont été publiés par une équipe espagnole.

FIGURE 7  
Tolérance au glyphosate  
(Roundup Ready™), Bombardement



Résultats : Confirmation de la présence de P-ract, EPSPS et T-nos

Obtenus : Jonction similaire entre les cassettes ( un seul produit PCR et 208 pb )

➔ **Observations :** en adéquation avec les éléments du dossier  
(duplication de la cassette EPSPS et de P-ract, délétion partielle de P-ract et EPSPS, délétion de T-nos)

**Site d'intégration:** pol-polyprotéine du rétrotransposon PREM2

( Hernandez et al. (2003) J.Cereal Sci.39 : 99-107 ; unpublished data INRA MDO )

## 7. AUTRES

Pour certains OGM (maïs GA21 et Starlink, colzas GT73, Topas 19/2, T45 et OXY 235) les parties d'inserts analysées ne paraissent pas présenter de modification(s) par rapport au(x) plasmide(s) utilisés pour la transformation, tels que disponibles dans les données publiques.

## 8. RÉSUMÉ DES OBSERVATIONS

Les observations obtenues dans le cadre des programmes européens montrent donc, par rapport aux cassettes décrites dans les données publiques, des délétions (Mon810, GA21, peut-être Bt176), des recombinaisons (T25, GTS 40-3-2, peut-être Bt176) et des répétitions de l'insert ou d'éléments génétiques au sein de l'insert ou dispersés dans le génome (T25, GA21, peut-être Bt176).

Il en résulte que le développement des méthodes de détection par certaines stratégies comme l'approche matricielle s'avère particulièrement difficile et coûteux si les données publiques ne sont pas fiables.

## 9. QUESTIONS

Ces observations amènent à poser quelques questions sur les mécanismes à la base des changements observés par rapport aux données publiques. La bibliographie permet de savoir que chez les plantes, le transfert d'ADN exogène déclenche une réaction de type « réponse à une blessure » qui active des nucléases et des enzymes de réparation de l'ADN et que l'ADN transféré est alors soit dégradé, soit utilisé comme point de départ à la réparation de l'ADN, ce qui peut résulter en son intégration dans l'ADN génomique après de possibles réarrangements.

Cet état de fait peut être accentué par différents événements antérieurs ou concomitants tels que :

- ◆ la possibilité d'une multimérisation dans le, ou entre, plasmide(s) avant la transformation ou d'insertions multiples au moment de la transformation ;
- ◆ des réarrangements sous l'effet d'une pression de sélection lors de la régénération de certaines plantes transgéniques (voir les exposés précédents) ;
- ◆ l'éventuelle capacité de certaines séquences, structures, de construits et de vecteurs de transformation à favoriser les recombinaisons avant, pendant ou après le processus de transformation.

Quoi qu'il en soit, aucun élément dans les résultats présentés ici ne permet de privilégier un ou plusieurs de ces mécanismes.

On peut, d'autre part, se poser la question quant au moment où ces changements se produisent. Il serait intéressant de déterminer s'ils se produisent entre vecteurs plasmidiques avant et/ou pendant la transformation, ou entre ADN plasmidique et ADN génomique pendant et/ou après la transformation. Là encore, aucun élément dans les résultats présentés ici ne permet en l'état de répondre. Pour conclure, rien dans les résultats des programmes de recherche présentés ici ne favorise particulièrement l'hypothèse d'une instabilité des inserts : aucune comparaison entre variétés d'un même OGM, ni entre plantes de différentes générations, n'a en effet été effectuée.

## 10. INTÉRÊT DES OGM COMMERCIAUX COMME MATÉRIEL D'ÉTUDES

Le premier intérêt des OGM commerciaux est de constituer un matériel bien caractérisé et suivi par les obtenteurs sur plusieurs générations. Leurs séquences et leurs conditions d'insertion sont connues, l'évolution des séquences – du moins au niveau du phénotype – est surveillée, etc. Leur étude permettrait donc d'apporter des éléments de réponse aux questions précédentes.

Les OGM commerciaux pourraient peut-être aussi nous apporter des informations sur les effets du mode d'introduction (bombardement, protoplastes, *Agrobacterium*) et, chez une même variété, sur les effets du type de construction, du type de pression de sélection et sur le moment d'application de cette pression. Ils pourraient aussi, pour une même espèce, nous apporter des éléments d'explication sur l'effet du fond génétique, voire sur l'influence des conditions de culture. Ils permettraient enfin d'élargir les résultats obtenus sur les modèles de type *Arabidopsis* aux génomes de plantes cultivées, et de réaliser ainsi des comparaisons entre organisations de génomes de plantes d'espèces différentes.

## V. Conclusion

La caractérisation des OGM commerciaux peut contribuer à fournir des informations sur les potentialités de réarrangements génomiques liées à l'insertion d'ADN transgénique.

La caractérisation des OGM commerciaux par les laboratoires officiels revêt une nécessité moindre depuis la nouvelle réglementation obligeant les obtenteurs à fournir une méthode de détection spécifique pour tout nouvel OGM mis sur le marché.

La caractérisation des OGM ne permettra d'études fondamentales sur la fluidité du génome et la stabilité des inserts que si l'accès aux plantes sur plusieurs générations est possible. Ces données sont très probablement riches d'enseignement mais restent soumises aux règles de la propriété intellectuelle, en particulier pour la fourniture du matériel biologique nécessaire à ces études.

Tant pour mieux comprendre les phénomènes régissant l'intégration d'ADN dans les génomes, que pour étudier la stabilité des inserts, d'autres travaux de recherche apparaissent nécessaires.



## QUESTIONS DANS LA SALLE

### Bruno TINLAND

---

Je souhaiterais savoir où vous avez recueilli les données publiques concernant le maïs Mon 810.

### Cécile COLLONNIER

---

Nous recueillons ces données dans des bases constituées par des organismes qui se consacrent uniquement à cette tâche, comme le BATS ou AgBios.

### Bruno TINLAND

---

Un article publié en Suisse a affirmé à tort la présence de T-nos à la fin de la chaîne Cry1A(b) du maïs Mon 810. Nous avons signalé cette erreur mais elle a été maintenue dans la base de données du BATS, puis dans un poster présentée l'année dernière à Barcelone. Elle a ensuite été communiquée à l'AFSSA, ce qui nous a fait perdre un temps considérable lors de l'homologation de certains de nos produits car nous avons dû redémontrer l'absence de T-Nos. L'AFSSA nous a également interrogé sur le T-nos tronqué car le poster présenté à Barcelone mentionnait qu'il se trouvait ailleurs dans le génome. Deux références étaient mentionnées sur ce poster. J'ai donc contacté les personnes concernées pour leur demander si elles avaient réalisé ces détections et elles m'ont affirmé n'avoir jamais trouvé de T-nos. Mieux encore, l'équipe du professeur Hernandez avait séquencé l'insert et n'avait pas trouvé de T-nos.

En conclusion, nous avons dû, deux semaines avant que l'AFSSA ne rende son avis, faire de nouveaux Southern pour démontrer que le T-nos était absent alors que

nous n'avions jamais affirmé sa présence dans le dossier d'homologation. Il faut donc rester prudent avant de lancer de telles affirmations car elles risquent de compromettre les processus d'homologation.

### Yves BERTHEAU

---

Nous ne représentons pas le BATS, mais les données qu'ils ont rassemblé sont connues de tout le monde et publiquement accessibles depuis plusieurs années.

### Bruno TINLAND

---

Certes, mais le poster présenté à Barcelone reprenait les données du BATS, ce qui n'était pas mentionné.

### Yves BERTHEAU

---

Ce poster reprenait effectivement les « données publiques » selon le BATS. De plus, le Dr Hernandez nous a bien fourni des résultats qui montraient la présence de petites séquences de T-nos.

### Cécile COLLONNIER

---

Je précise que nous n'avons cherché à accuser personne. De tels événements sont évidemment regrettables et c'est bien pour cela que des réunions de ce type sont organisées. Si ce problème est survenu, c'est parce qu'il est difficile d'accéder à ces données et que nous sommes obligés de nous référer à des données qui, en l'occurrence, n'avaient manifestement pas été rectifiées bien qu'elles soient accessibles depuis plusieurs années.

### Yves BERTHEAU

---

Je tiens à re-préciser que nous avons deux activités. La première est une mission d'expertise pour le compte des pouvoirs publics et nous avons accès, dans ce cadre, à des informations dont nous ne parlons pas publiquement. Dans le cas présent, nous nous plaçons dans les mêmes conditions que les laboratoires privés qui développent des méthodes. Pour avoir présidé la commission AFNOR, je peux vous dire que, pendant deux ans, les laboratoires français ont cherché à détecter la présence de T-nos dans le maïs Mon 810 sur la base d'une information apparemment erronée, Monsanto étant membre de la commission. Or il est difficile pour les laboratoires d'analyses privés de développer un test. Nous devons donc trouver un moyen de nous assurer que les informations qui circulent sont correctes.

## Bruno TINLAND

---

La question aurait peut-être due nous être posée...

## Gilles-Eric SERALINI

---

Vous avez présenté une technique de PCR quantitative matricielle qui permettrait de détecter des OGM inconnus, mais vous avez quand même besoin d'une base d'amorces potentielles. Cette méthode pourrait-elle permettre de détecter des OGM expérimentaux qui comporteraient d'autres inserts ?

## Cécile COLLONNIER

---

Oui, à condition qu'ils utilisent des éléments génétiques pour lesquels nous détenons des tests de détection.

## Gilles-Eric SERALINI

---

Elle ne permettrait donc pas de détecter des OGM expérimentaux.

## Cécile COLLONNIER

---

Non. Il aurait été plus exact de parler d'OGM « non déclarés » plutôt que d'OGM « inconnus ».

## Alain TOPPAN

---

Vous avez présenté des résultats concernant des événements de transformation commerciaux, tous obtenus par des méthodes de transformation physique. Avez-vous fait les mêmes analyses sur du matériel obtenu suite à transformation agrobactériologique ?

## Cécile COLLONNIER

---

Aucune étude de ce type n'a été réalisée. Nous n'avons donc pas pour le moment d'éléments sur les méthodes utilisant *Agrobacterium*.

## Yves BERTHEAU

---

Et ce pour un simple problème de disponibilité des standards.

## Gilles-Eric SERALINI

---

Une commission comme la nôtre pourrait peut-être demander une caractérisation des inserts après transfection.

## Cécile COLLONNIER

---

Ce n'est pas à nous de prendre cette décision. La seule chose que nous puissions dire, c'est qu'il y a manifestement un problème de circulation et d'accessibilité de l'information. Monsieur Tinland parlait tout à l'heure du temps qu'il avait perdu, mais nous en perdons nous aussi lorsque nous faisons un nouveau séquençage de l'insert alors qu'il existe déjà.

## Michel CABOCHE

---

Je trouve curieux que vous ne connaissiez pas la séquence au moment où vous réalisez vos analyses.

## Cécile COLLONNIER

---

Je rappelle que nous avons deux missions. D'une part, une mission d'expertise, réalisée dans un cadre réglementaire, ce qui nous permet d'avoir accès à tous les dossiers de la CGB voire, dans le cadre de la répression des fraudes, à des données confidentielles dont nous ne parlons pas ici.

D'autre part, la mise à disposition des acteurs économiques de méthodes basées uniquement sur des données publiques. Dans ce cadre, nous nous trouvons dans les mêmes conditions que des laboratoires privés, tels que par exemple GeneScan Eurofins, et donc nous ne disposons pas des séquences des inserts.

## Henk JOOS

---

C'est exactement pour cette raison que nous sommes d'accord avec le système introduit par le règlement 1829/2003 qui prévoit une validation des méthodes soumises par les différentes sociétés et une information sur la séquence des divers éléments. Cela fait désormais partie du processus de révision des dossiers. Je ne vois donc pas vraiment sur quoi nous discutons aujourd'hui.

## Yves BERTHEAU

---

Je suis entièrement d'accord sur l'intérêt du règlement 1829/2003. Mais, actuellement, dans le cadre des filières OGM et non-OGM, le travail des laboratoires se réoriente vers une diminution de la durée et du coût des analyses. Or cela ne passe plus seulement par l'analyse des fragments de bordure fournis dans le cadre de l'article 1829/2003 mais aussi par des approches de type matriciel sur des construits spécifiques ou sur des ciblage. Nous avons donc besoin d'autres informations. Il faut aussi savoir que s'il existe une méthode de détection pour chaque OGM, les laboratoires privés devront avoir autant de systèmes de détection et de quantification.



# MUTAGÈNESE INSERTIONNELLE CHEZ LE RIZ

JEAN-CHRISTOPHE BREITLER  
CIRAD MONTPELLIER

## I. Introduction

Les riz cultivés sont diploïdes, possèdent 12 chromosomes et l'espèce cultivée la plus étudiée est le Nipponbare. Cette plante est devenue un modèle pour les monocotylédones (céréales), et ce pour de multiples raisons : c'est la première céréale de consommation humaine, c'est la troisième au palmarès mondial de la production, elle possède un petit génome (environ 430 mb) et de très nombreuses données moléculaires sont disponibles.

Les similarités de séquences et d'organisation des gènes avec les autres céréales sont maintenant bien connus. Quasiment 100 % des gènes connus du blé, de l'orge ou du maïs ont un homologue chez le riz.

Posséder une plante modèle pour les monocotylédones est également intéressant pour réaliser des comparaisons avec les dicotylédones, qui connaissent une évolution séparée depuis 150 à 180 millions d'années. Ses caractéristiques biologiques sont elles aussi intéressantes ; son cycle de culture est court, sa taille est réduite et elle se prête très bien aux techniques de laboratoire et notamment à la transformation génétique. En termes de séquençage du génome, plusieurs initiatives – publiques et privées – ont été lancées par Monsanto, Syngenta, le BGI en Chine ou l'IRGSP et le séquençage complet du génome du cv Nipponbare est maintenant presque achevé.

## II. Génomique fonctionnelle

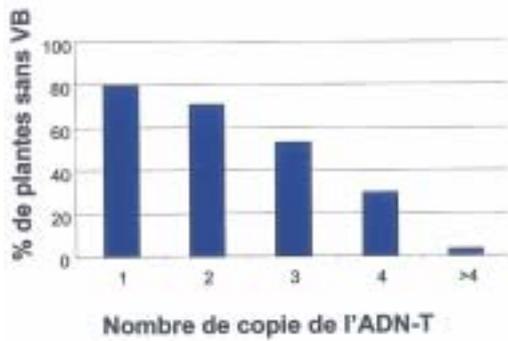
Pour faire de la génomique fonctionnelle en utilisant la transformation génétique, il faut avoir un protocole de transformation génétique efficace. A partir des travaux de Hei, publiés en 1994, nous avons développé au laboratoire un protocole de transformation génétique du riz par *Agrobacterium tumefaciens* qui est particulièrement efficace. Les temps et le coût de production ont été réduits, et l'efficacité augmentée en jouant sur le choix du matériel de départ, la méthode de co-culture et de sélection des cellules transformées. Ceci nous a permis d'augmenter de 5 à 10 fois la quantité de plantes transgéniques produites au cours d'une expérimentation.

Pour constituer la collection de mutants Génoplante nous avons utilisé 3 vecteurs binaires différents mais tous de type enhancer trap. On a obtenu en moyenne 4,3 transformants primaires indépendants par cal co-cultivé avec l'agrobactérie. Ces plantes présentent en moyenne 2,2 copies de l'ADN-T intégrés à 1,4 locus génétique. Dans 30 à 35 % des plantes, il est possible de détecter la présence de séquences issues du vecteur binaire (Figure 1).

Ces analyses ont également permis de constater la redondance des résultats puisque les travaux de Hei aboutissaient à une valeur moyenne d'intégration de 2,1 ADN-T et qu'une équipe coréenne, qui a généré une banque de plus de 100 000 mutants d'insertion ADN-T, a trouvé une valeur moyenne de 2,3. On constate par ailleurs que plus le nombre de copies augmente, plus la fréquence d'insertion de séquences du vecteur binaire augmente.



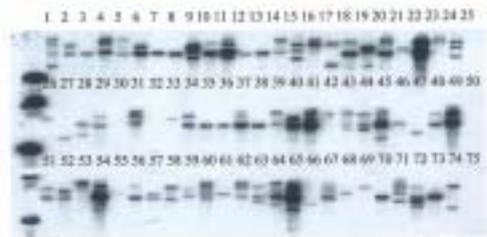
FIGURE 1  
RÉPARTITION DES ADN-T dans la population



sonde  
*Hpt*



Sonde  
*gusA*



Sonde  
Vecteur  
binaire



### III. Données issues du projet Génoplante

Voici un résumé des ressources produites à ce jour dans le cadre du projet Génoplante. 11 643 calcs ont été co-cultivés au cours de 7 expériences de transformation, permettant la production de 46 685 lignées transgéniques indépendantes. Nous avons produit 35 685 séquences flanquantes de la bordure gauche de l'ADN-T. 19 786 correspondent à des séquences exploitables, c'est à dire de bonne qualité, pour lesquelles on retrouve la séquence de l'ADN-T, qui ont une taille supérieure à 30 pb et que l'on peut positionner sans ambiguïté sur le génome du riz, soit une efficacité de 60 % similaire à celle obtenue pour les collections d'*Arabidopsis thaliana*. Nous sommes actuellement en train de développer un protocole de production à haut débit des FST situées à la bordure droite de l'ADN-T.

#### 1. RÉTROÉLÉMENTS DE TYPE TOS

Combien de lignées d'insertion doit-on produire pour être certain d'avoir muté 99 % des gènes du riz ? D'après les travaux de Jeon et al, il faudrait produire 471 000 mutants ADN-T. Si l'on prend la moyenne des insertions ADN-T et Tos17 de nos lignées, notre collection doit totaliser près de 200 000 insertions. Hirohiko Hiroshita a beaucoup travaillé sur les rétroéléments de type Tos et nous savions, lorsque nous avons commencé à constituer notre banque de mutants, que les rétroéléments de ce type étaient activés par la culture *in vitro*. Nous en avons tenu compte dans le cadre de nos études de génomique fonctionnelle. Nous avons ainsi découvert que le riz comptait nombre de rétrotransposons, notamment 32 éléments de type Tos, dont Tos10, Tos17 et Tos19 qui sont activés par la culture *in vitro* pour les riz japonica. Le cultivar Nipponbare en contient deux copies. nous avons pu montrer que celle du chr7 est active et celle du chr10 inactive et présente une forte méthylation. L'étude de plus de 40 représentants du genre *Oryza* a permis de montrer qu'ils contiennent de 1 à 10 copies de ce rétrotransposon, actives ou non en fonction de

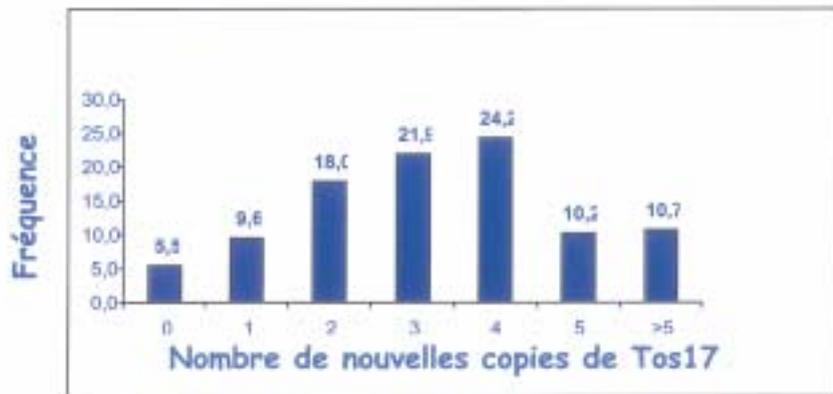
leur degré de méthylation, et qu'il est possible de l'utiliser pour des études phylogénétiques. Ce rétrotransposon est stable, en dehors du contexte CIV et les nouvelles copies issues de la CIV sont héréditaires après régénération. Nous avons pu montrer la colocalisation de différentes copies de Tos17 avec des QTL contrôlant le nombre de plantules régénérées par calcs, ou encore positif pour la régénération, ou encore un QTL d'induction des calcs embryogènes à partir d'anthères. 95 % de nos lignées présentent 1 à 8 nouvelles copies de Tos17, la moyenne étant de 3,2 (Figure 2).

Hirohiko Hiroshita et son équipe ont beaucoup travaillé sur le rétroélément Tos17, au point de l'utiliser comme mutagène insertionnel pour générer une banque de mutants, ce qui présente l'avantage de ne pas donner naissance à des plantes transgéniques. Ils ont produit 47 000 lignées qui totalisent plus de 500 000 insertions, en utilisant des temps de culture *in vitro* pouvant aller jusqu'à 18 mois, ce qui est susceptible de générer jusqu'à trente nouvelles copies de rétroélément Tos 17 dans les plantes régénérées. Ils ont produit 42 000 FST et obtenu 16 784 bonnes séquences, soit un taux d'efficacité de l'ordre de 40 %, alors qu'elle est de 60 % pour les ADN-T (*Arabidopsis thaliana* ou *Oryza sativa*). Ils ont pu montrer que l'insertion des nouvelles copies avait lieu préférentiellement dans les séquences géniques. En étudiant les points d'insertion, ils ont défini un consensus pour l'insertion. Ils ont aussi pu montrer qu'il existait des points chauds et des points froids pour l'intégration de Tos17. Enfin, dans un article de 2004, Liu et al ont montré qu'une nouvelle copie de Tos17 est susceptible de modifier la méthylation des régions du point d'insertion, avec éventuellement une influence négative sur l'expression des gènes situés autour de ce point.

Dans notre laboratoire, nous venons de mettre au point un protocole d'amplification spécifique des nouvelles copies de Tos17. Nous allons maintenant nous lancer dans la production à haut débit de FST sur notre collection.



**FIGURE 2**  
**Multiplication de Tos17**  
**dans les lignées transgéniques TO**



## 2. RÉPARTITION DES ADN-T DANS LE GÉNOME

La répartition des ADN-T dans le génome n'est pas aléatoire mais uniforme (Figure 3). Une recherche de type Blast sur les clones BAC et PAC représentant 410 Mb du génome du riz a permis de positionner les insertions à partir des FST produites sur les 12 chromosomes du riz. La densité moyenne d'insertion est de 18,5 ADN-T par Mb et la distribution des ADN-T apparaît uniforme sur les chromosomes au niveau macromoléculaire, ce qui est cohérent avec les données de la littérature. Néanmoins, les chromosomes 1, 2 et 3 présentent une densité d'insertion légèrement supérieure ce qui a aussi été remarqué pour Tos17. Il est à noter que ces 3 chromosomes qui représentent 31 % du génome du riz sont plus riches en euchromatine que les autres et que 40 % des FL-cDNA connus sont issus de ces chromosomes. C'est une première indication que, dans le riz, les ADN-T sont répartis dans le génome et préfèrent les régions géniques.

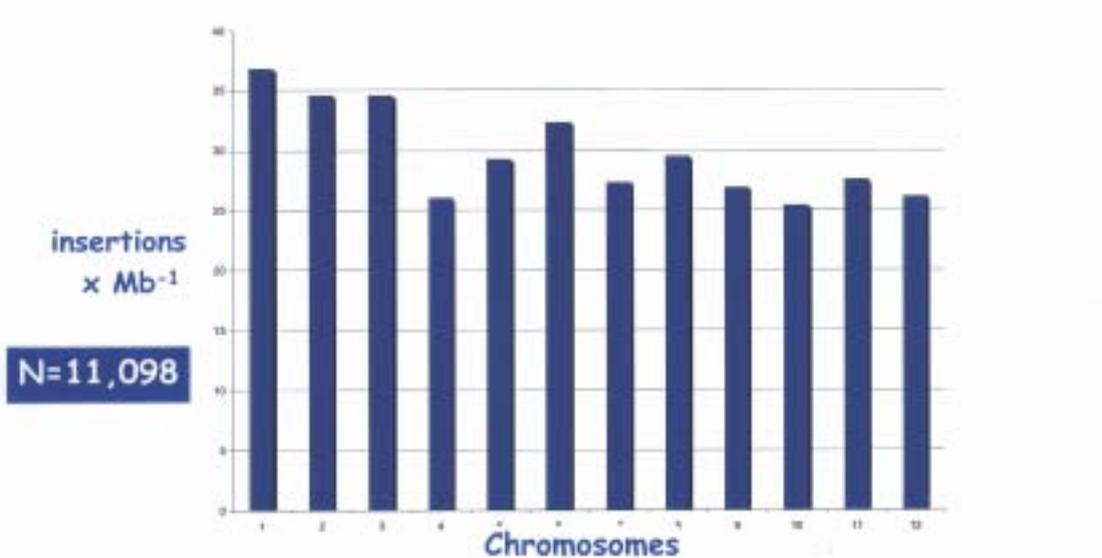
Une étude plus fine, conduite sur le chromosome 1 a permis de confirmer cette tendance (Figure 4). Sur ce chromosome, nous avons pu voir que 71,5 % des ADN-T étaient insérés dans la zone comprise entre 1500 pb avant l'ATG et 750 pb après le signal de fin de transcription. Par ailleurs, 47 % des ADN-T étaient insérés dans une zone comprise entre 250 pb avant l'ATG et 250 pb après le signal de fin de transcription. Des résultats similaires ont été obtenus sur deux autres collections de mutants d'insertion en Chine et en Corée.

Puisque les FST de l'équipe d'Hiroshita étaient publics, nous avons utilisé 15 808 FST de Tos17, 15 717 FST gauche issus de notre collection et 30 505 cDNA pleine longueur disponibles dans les bases de données et les avons positionnés sur le génome du riz. Cette analyse confirme que l'insertion aussi bien des ADN-T que de Tos17, n'est pas uniforme sur les chromosomes et que leur répartition est similaire et suit la répartition des gènes représentés par la répartition des FL-cDNA, avec donc une préférence marquée pour les régions subtélomériques et une aversion prononcée pour les zones péricentromériques (Figures 5 et 6). Nous avons ensuite vérifié que l'ADN-T n'aimait pas les séquences répétées. Nous avons enfin réalisé des analyses de type BlastX sur une base de données comprenant 893 CDS d'éléments transposables de riz et avons trouvé 5 à 10 fois moins d'insertions que ce que l'on pourrait trouver avec des insertions aléatoires.

Comme Hirochika l'a fait pour Tos17, nous nous sommes intéressés aux types de gènes interrompus par les ADN-T. Les logiciels d'annotation de séquences n'étant pas totalement fiables, nous préférons utiliser les séquences de cDNA pleine longueur connues pour voir où s'intègrent les ADN-T. Que ce soit pour Tos17 ou nos ADN-T, moins de 20 % des séquences interrompues correspondent à un ADNc de fonction connue. Les pourcentages plus élevés pour le rétrotransposon Tos17 comparés à ceux observés pour l'ADN-T, reflètent une insertion préférentielle de cet élément dans les régions codantes. En effet, Hirochika a pu montrer que Tos17 s'intègre avec une fréquence 3 fois plus élevée dans les régions codantes des gènes. Si on compare les ADNc connus pour différentes classes de gènes qu'ils représentent, avec les insertions ADN-T ou Tos 17, on s'aperçoit que l'ADN-T ne semble pas présenter de préférence pour telle ou telle classe, sauf pour les gènes liés à la traduction. Hiroshita a publié l'année dernière un article sur ce sujet dans lequel il montre que Tos17 aurait une préférence pour les gènes codant pour des kinases et pour les gènes de défense (Figure 7). Tos 17 présente une répartition très différente de celle des autres rétrotransposons qui sont sur-représentés dans les régions intergéniques et la zone péricentromérique. Ces rétrotransposons s'intègrent préférentiellement dans les séquences codantes des gènes avec un biais très fort pour les gènes de défense et ceux codant pour des kinases. Ceci peut s'expliquer par une adéquation parfaite entre le % de GC optimal pour l'intégration de Tos17 et celui de ces gènes ; de plus, ces gènes sont organisés en cluster et représentent donc des zones riches en gènes, cible préférée de Tos17 (Figure 8). Les auteurs voient donc en Tos17 un moteur de l'évolution rapide du riz qui, en générant des mutations et/ou des réarrangements dans ces clusters de gènes, favorise l'apparition de nouveaux gènes de défense ou de nouvelles voies de signalisation cellulaire en réponse aux modifications de l'environnement.

Actuellement, nous disposons encore de trop peu de données pour faire un travail fin d'analyse de l'intégration des ADN-T comme cela a pu être fait pour *Arabidopsis thaliana*. Ceci est prévu dès que nous aurons généré suffisamment de FST droite. Nous avons enfin examiné la séquence génomique des 138 lignées dont nous connaissons la FST gauche et droite et nous avons constaté qu'il y avait une délétion moyenne de 58,9 pb au point d'insertion. Cette délétion n'est jamais nulle et peut aller de 5 pb à 345 pb.

FIGURE 3  
Distribution des ADN-T sur le génome du riz



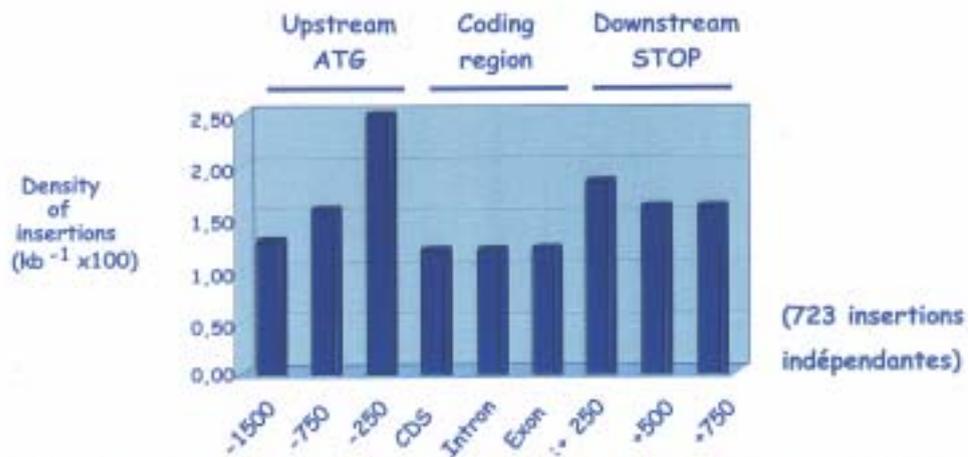
95.9 % des FST sont positionnées sur la séquence du génome du riz  
Distribution « uniforme » sur les différents chromosomes



FIGURE 4

## Zoom sur le chromosome 1

Sallaud et al, plant J, 2004



71.5% des ADN-T sont insérés dans la zone comprise entre 1500 pb avant l'ATG et 750 pb après le signal STOP de transcription

47% des ADN-T sont insérés dans la zone comprise entre 250 avant l'ATG et 250 après le signal STOP de transcription (résultat similaire pour *Arabidopsis* : Szabados et al, 2002. Plant J.)

La fréquence d'insertion est plus élevée de part et d'autre de la séquence codante

FIGURE 5

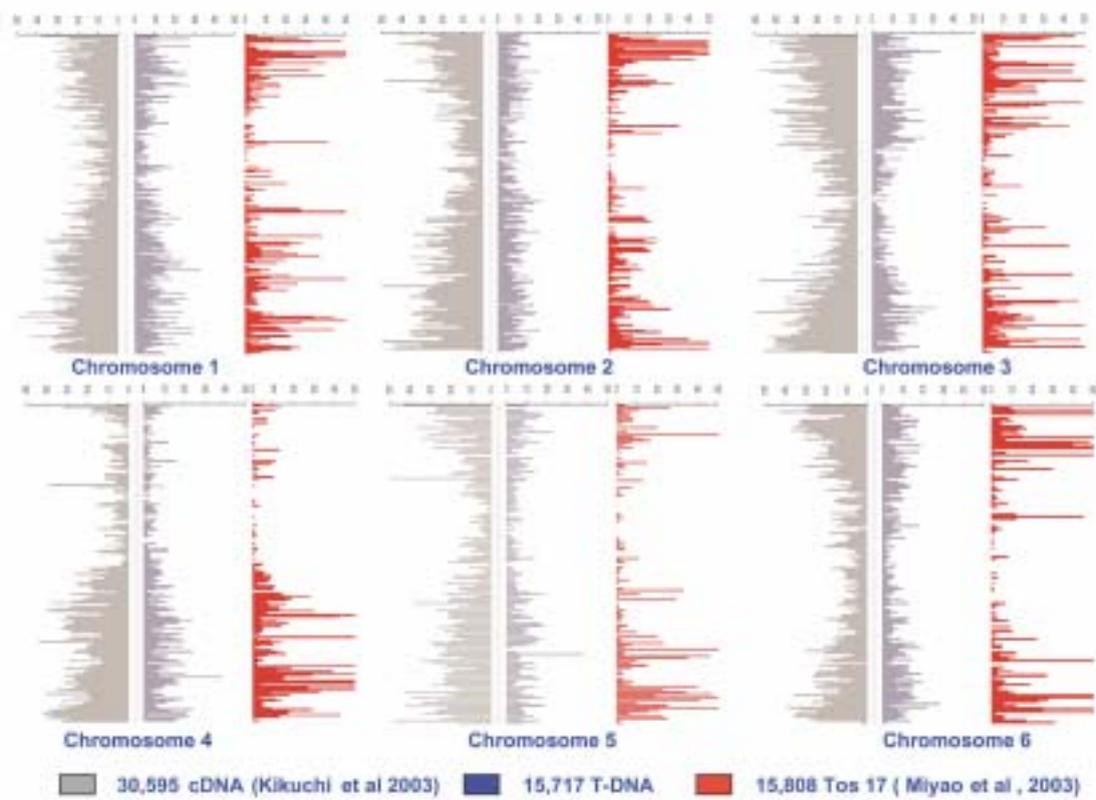


FIGURE 6

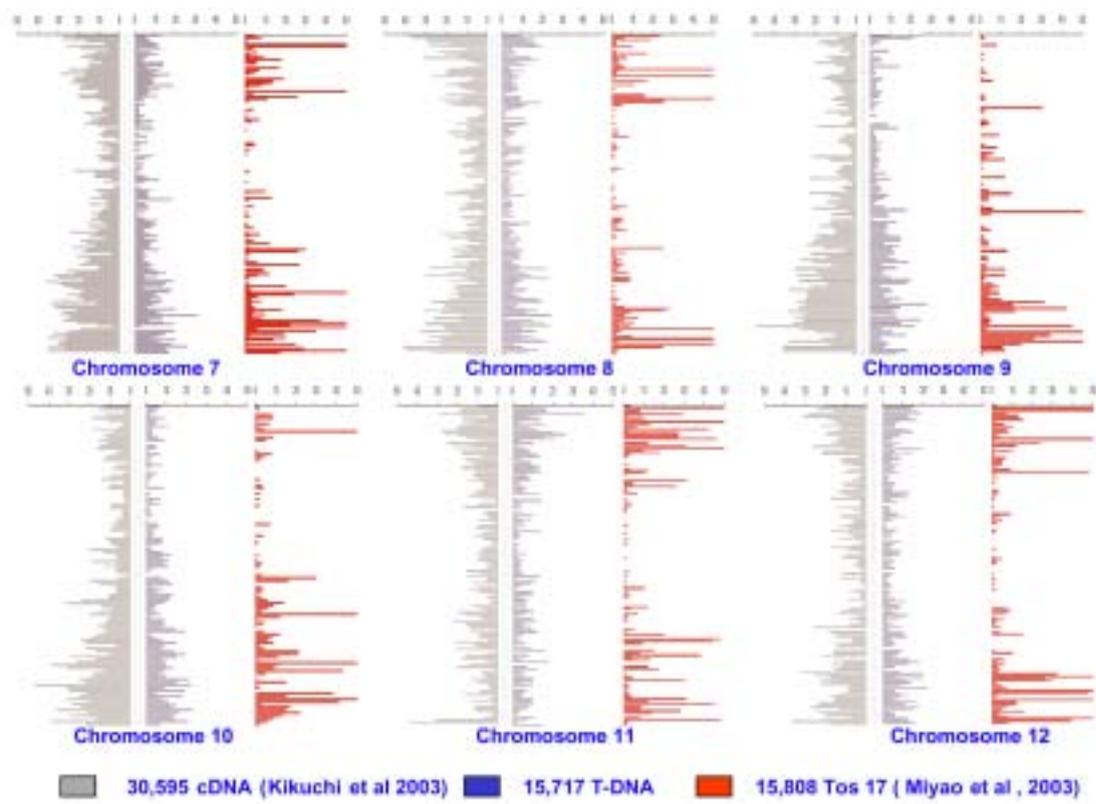
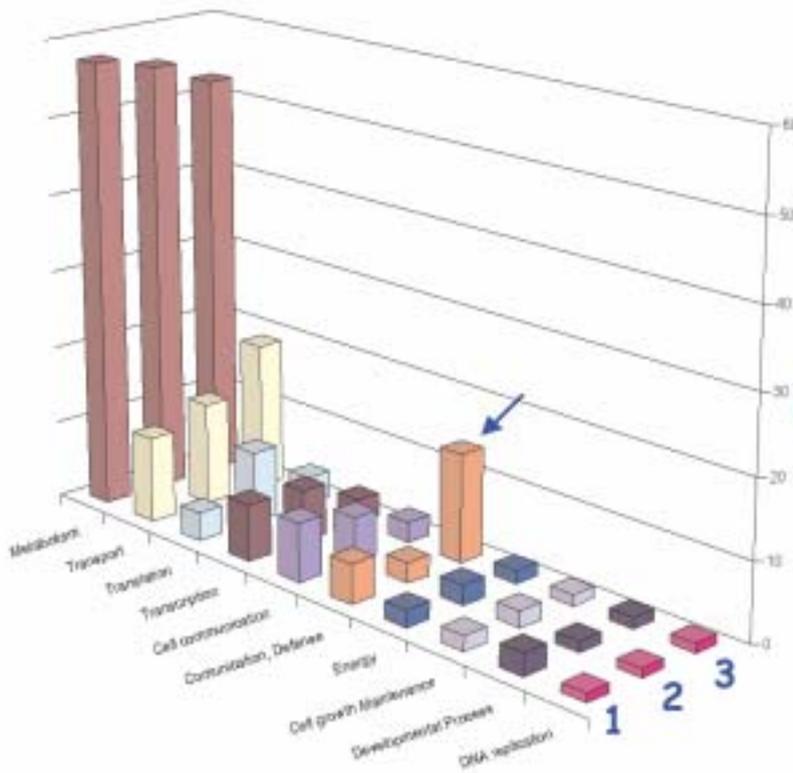


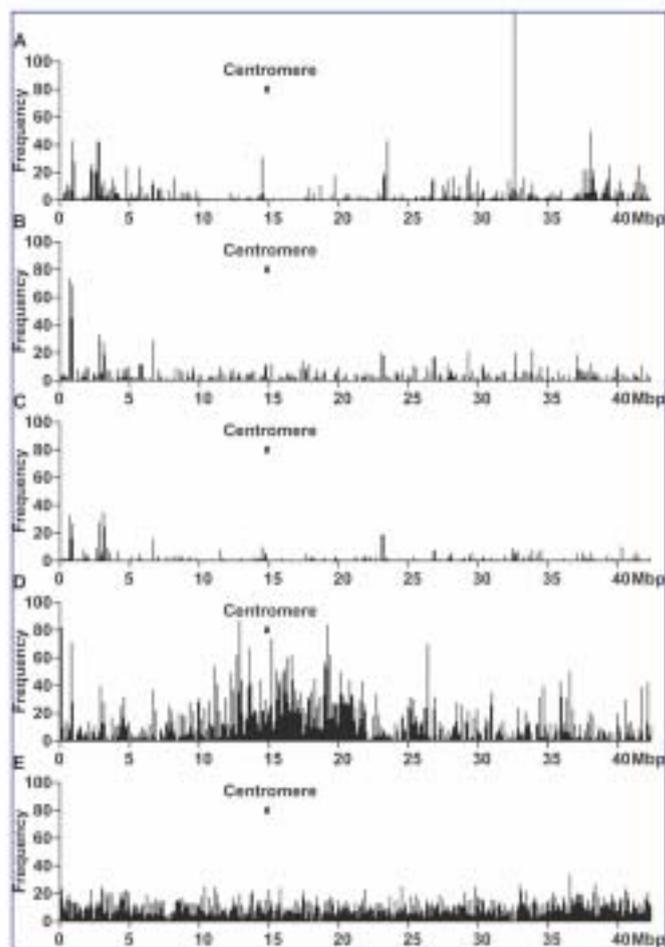
FIGURE 7  
L'ADN-Tet Tos17 ont ils des préférences ?



- 1. T-DNA : 2,259
- 2. FL cDNA : 9,734
- 3. Tos 17 : 3,472



**FIGURE 8**  
**Tos17, nu moteur de l'évolution**



**Tos17**

**Kinases**

**Gènes de défense**

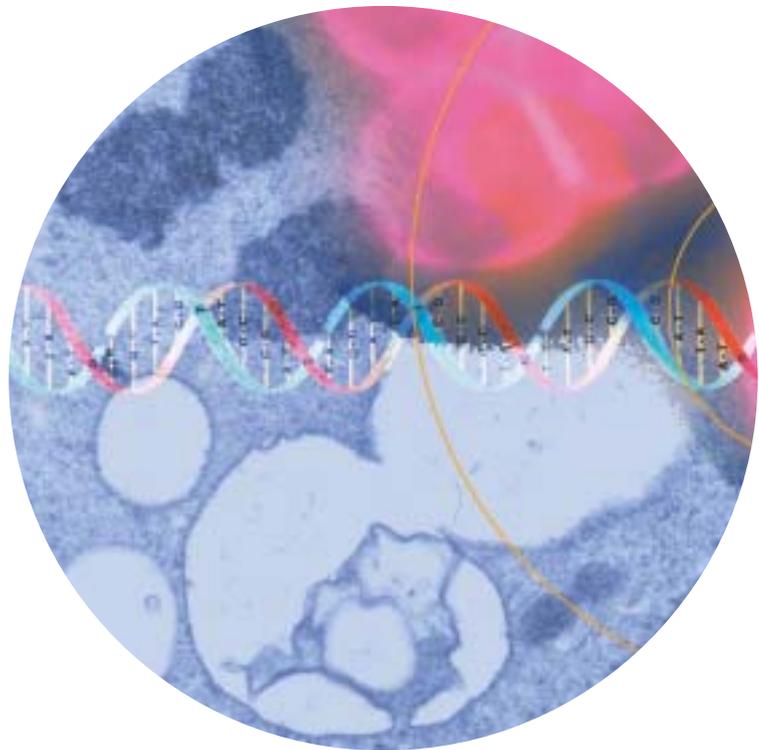
**Rétrotransposons**

**EST de riz**

## IV. Conclusion

- ◆ Il n'est pas si facile de générer des mutants « perte de fonction ».
- ◆ Chez *Arabidopsis thaliana*, environ 40 % des phénotypes observés peuvent être associés à l'insertion d'un ADN-T. Concernant la banque d'insertion Tos17 d'Hirochika seul 5 % à 10 % des mutations observées peuvent être reliées à l'insertion d'un rétroélément Tos17.
- ◆ La collection de mutants de riz produite au Cirad est systématiquement analysée sur la base d'une altération morphologique des grains, de la réponse à un

champignon pathogène ou encore au champ sur la base d'altérations morpho-physiologiques. Dans les deux premiers cas, seul 1,5 % des lignées présentent un phénotype mutant et 20 % des lignées présentent une morpho-physiologie altérée au champ, ce qui est faible sachant que chaque lignée peut présenter des variations somaclonales liées au passage en culture in vitro, en plus de 2,2 copies de l'ADN-T et 3,2 copies de Tos17 intégrées au génome en moyenne. Il n'est donc pas si facile de générer des mutants pertes de fonction, ou du moins d'obtenir des variations phénotypiques importantes pour un grand nombre de lignées.





## QUESTIONS DANS LA SALLE

### Marc FELLOUS

Il a été montré qu'il n'y avait pas de colinéarité chez la souris. En va-t-il de même chez le riz ? Les sites où une insertion peut être placée sont-ils saturés très rapidement ?

### Jean-Christophe BREITLER

Ce n'est pas le cas avec l'ADN-T mais cela l'est avec Tos17. Hiroshita a en effet montré que Tos17 avait une tendance à l'agrégation, comme si certaines zones du génome lui plaisaient davantage que d'autres. En revanche, si la répartition de l'ADN-T est centrée sur les régions géniques, elle est aussi assez uniforme.

### Marc FELLOUS

Chez la souris, il semble plus facile de toucher la région 5' des gènes plutôt que leur région 3'. En va-t-il de même chez le riz ?

### Jean-Christophe BREITLER

La densité d'insertion la plus forte se retrouve dans les 250 pb situés en amont de l'ATG. Les ADN-T préfèrent s'intégrer soit après le codon Stop, soit après l'ATG. Ce n'est en revanche pas le cas pour Tos17 dont l'insertion préférentielle est trois fois plus importante entre l'ATG et le codon Stop que dans les éléments de régulation.

### Marc FELLOUS

Si l'on modifie un gène de régulation, on pourrait s'attendre, non pas à des pertes de fonction, mais à des modifications de régulation. Il serait intéressant de réaliser une étude du transcriptome pour vérifier ce point.

### Jean-Christophe BREITLER

Nous l'envisageons, mais ce n'est pas évident. Les plantes sont en effet composées de familles multigéniques. De plus, les gènes sont souvent répétés. Par conséquent, si l'on modifie l'activité ou la régulation de l'un d'entre eux, on n'observe rarement un effet. D'après les Coréens, les insertions conduisent à des variations phénotypiques très fines. Si l'on fait pousser une collection de mutants sous serre, il faut vraiment les examiner de très près pour observer des variations phénotypiques.

# UN MODÈLE STATISTIQUE POUR L'INTÉGRATION DE L'ADN-T DANS LE GÉNOME D'ARABIDOPSIS THALIANA

**ALAIN LECHARNY**

INSTITUT DE BIOTECHNOLOGIE DES PLANTES  
ET UNITÉ DE RECHERCHE EN GÉNOMIQUE VÉGÉTALE

## I. L'intégration de l'ADN-T

Depuis un certain temps, on suppose que l'ADN-T s'inscrit dans le génome par des mécanismes de recombinaison non-homologue. On observe des micro-régions de similarité entre l'ADN-T – surtout sa bordure gauche – et le pré-site d'insertion dans le génome. L'insertion de l'ADN-T s'accompagne de délétions, aussi bien au niveau de l'ADN-T que de l'ADN des plantes et, assez fréquemment, d'ADN filler, c'est-à-dire de séquences d'ADN qui se placent entre l'ADN-T et le génome des plantes.

Ces observations ont donné naissance au modèle présenté par Bruno Tinland en 1996. D'autres modèles (Meza et al., Windels et al.) ont été proposés pour rendre compte des différentes situations observées après intégration de l'ADN-T.

Après l'intégration de l'ADN-T, soit en copie unique, soit en copie double en tandem, il a été fréquemment observé des modifications assez importantes au niveau du chromosome, avec des translocations de fragments importants et des inversions de régions assez larges.

## II. Etudes sur l'intégration de l'ADN-T

L'arrivée de nombreuses données de FST a permis d'étudier de manière statistique les remaniements observés, ainsi que la densité des insertions et la nature fonctionnelle du site et de les rapporter à la densité locale des gènes et à la typologie des chromosomes. Les études présentées portent sur environ 10 000 FST séquencées à partir de la collection de mutants ADN-T produite à l'INRA de Versailles et qui a fait l'objet, dans le cadre d'un programme Génoplante, d'une caractérisation systématique de la bordure gauche, ainsi que de certaines bordures droites.

Actuellement, 55 000 lignées ADN-T ont été caractérisées par une FST, avec un rendement de l'ordre de 60 % à 65 % de réussite. Une fois les séquences FST obtenues, on peut les positionner le long des chromosomes et en vis-à-vis des différents éléments génomiques.

Le mode de production des FST est bien connu (extraction de l'ADN, digestion par des enzymes de restriction, ligation d'un adaptateur, PCR I, puis PCR II) et permet d'obtenir des matrices suffisamment propres pour être séquencées.

Maintenant que nous avons un grand nombre de données FST (330 000 FST cartographiables sur le génome d'*Arabidopsis* ont été produites par différents projets dans le monde), nous pouvons établir des courbes de saturation pour les CDS et pour les gènes. Nous n'avons pas pu caractériser de gènes qui ne soient pas atteignables par les FST. Les gènes actuellement non affectés par un ADN-T sont les plus petits. Les données actuelles montrent que pour saturer les gènes il faut de l'ordre de 350 000 FST et 600 000 FST pour les CDS. Nous pouvons donc penser que nous avons relativement saturé le génome d'*Arabidopsis thaliana* si l'on considère l'ensemble des collections mondiales.

Le parallélisme entre densité des gènes et densité d'insertion des FST est quasiment parfait. Ceci semble indiquer l'existence d'une contrainte identique entre l'insertion des gènes et l'insertion des ADN-T.

La probabilité d'insertion de l'ADN-T dans les introns et les exons est la même mais il y a un pic marqué en amont de l'ATG. On note aussi une augmentation des insertions dans la région 3', mais elle reste plus faible que dans la région 5'.

Après analyse de la collection constituée à Versailles, nous avons constaté que 11 % de l'ADN-T était inséré en tandem, que 6 % avait fait l'objet d'une double insertion en tandem et qu'il y avait en moyenne 1,5 ADN-T par lignée.

● Nous avons trouvé 15 % de vecteurs indiquant une mauvaise coupure de l'ADN-T dans *Agrobacterium*. La présence d'ADN filler varie selon les collections entre 25 % et 50 %, avec une moyenne de l'ordre de 50 nucléotides. Quant aux délétions sur l'ADN génomique observées dans 80 % cas, elles représentent dans leur grande majorité entre 10 et 100 pb (nous n'avons trouvé que 3 % de translocations).

● Munis de ces connaissances, nous avons étudié environ 10 000 séquences de FST et nous avons constaté qu'il existait, dans les séquences amont et aval du site de pré-insertion de l'ADN génomique, une différence par rapport à la composition nucléotidique moyenne de la région. On sait également qu'il existe des délétions de l'ADN-T, de longueur et de profil différents sur la bordure gauche et la bordure droite. Nous avons en effet observé que la grande majorité des ADN-T ne subissait pas de délétions sur la bordure gauche mais qu'il y existait sur la bordure droite trois régions préférentielles de terminaison de l'ADN-T d'intégration. Nous avons alors essayé de relier ce phénomène de délétion aux micro-régions de similarité observées. Nous avons ainsi observé une sur-représentation du nucléotide T en amont du site de pré-insertion et, de manière générale, une similarité entre la région finale de l'ADN-T intégré et le site de pré-insertion.

● Ceci nous a amené à compléter le modèle d'intégration de l'ADN-T en indiquant que les régions où le nucléotide T était sur-représenté étaient probablement des régions d'insertion préférentielle et que la région de similarité, qui peut s'étendre sur six ou sept nucléotides, était rarement totalement identique entre l'ADN-T et l'ADN génomique de la plante. Nous avons également montré la relation entre la région de similarité de l'ADN de la plante et les délétions de l'ADN-T au moment de son intégration, tant sur la bordure gauche que sur la bordure droite. Enfin, nous supposons que le positionnement relatif de ces deux régions détermine la délétion observée sur le génome de la plante.

### III. Conclusion

● Selon ce modèle, l'ADN-T peut s'intégrer partout dans les chromosomes avec une préférence pour les régions en amont des gènes qui n'est donc pas dépendante de la séquence mais plutôt de la relative instabilité ou de l'accessibilité de la région promotrice des gènes.



## QUESTIONS DANS LA SALLE

Barbara HOHN

L'ADN-T semble privilégier l'euchromatine mais il peut aussi s'intégrer dans l'hétérochromatine. Avez-vous observé dans ces dernières régions des intégrations d'ADN-T qui ne s'exprimeraient pas ?

Alain LECHARNY

Il a été montré que l'ADN-T intégré dans ces régions était parfois exprimé.

Marc FELLOUS

Je souhaiterais faire un commentaire sur l'utilisation de l'ADN-T ou du Tnos en vue de réaliser des mutants d'insertion. Lors de nos travaux, nous avons utilisé de manière extensive le transposon P et, en travaillant sur deux gènes, nous avons exploré toutes les banques d'insertion sans le trouver. Or, vu le nombre d'insertions recueillies, nous aurions dû saturer plusieurs fois le génome. Il y a donc incontestablement des zones qui échappent à l'insertion.

Alain LECHARNY

Nous allons pouvoir commencer à étudier les gènes qui ne sont jamais touchés. La difficulté sera de définir les régions dans lesquelles l'insertion pourra avoir une action sur l'expression des gènes. Tant que nous n'aurons pas le modèle de chaque gène, nous pouvons nous fixer cela pour objectif, du moins pour les 18 000 gènes *d'Arabidopsis* que nous connaissons. J'ajoute qu'il existe une bonne corrélation négative entre la taille des gènes et l'absence d'ADN-T en leur sein.

Jean-Christophe BREITLER

Je précise que le projet *Agricola*, qui porte sur *Arabidopsis thaliana*, a pour objectif de générer des mutants pour chaque gène *d'Arabidopsis* connu, mais sur la base de l'ARN interférens et pas des mutagenèses insertionnelles. Il sera certainement très intéressant de voir les résultats qui pourront être obtenus en ciblant la mutagenèse sur des gènes précis et de comparer cette banque aux banques de mutants d'insertion produites, ce qui nous permettra de savoir s'il existe des gènes non-mutables.

# ANALYSE DE STABILITÉ EFFECTUÉE À DES FINS RÉGLEMENTAIRES

**BRUNO TINLAND**  
MONSANTO

## I. Introduction : la recombinaison génétique

La recombinaison illégitime implique l'absence d'homologie de séquence ou une homologie restreinte. Elle recouvre l'insertion des transposons, l'intégration de nouveaux éléments génétiques et les événements de réparation de l'ADN. Pour sa part, la recombinaison homologue implique une homologie de séquence étendue. Elle peut résulter d'une recombinaison méiotique ou être liée à un événement de réparation conservatrice de la séquence de l'ADN. D'après les quelques études effectuées sur les fréquences de recombinaisons chez les plantes, on peut estimer que la fréquence des recombinaisons illégitimes est de l'ordre  $10^{-8}$ , celle des recombinaisons homologues ectopiques (entre homologues situées sur des loci différents) de l'ordre de  $10^{-8}$ , et celle des recombinaisons homologues de gènes « liés » (physiquement liés sur une distance de quelques kilobases), de l'ordre de  $10^{-4}$  (voir Kirik et col., EMBO J 19: 5562 ; Puchta, Genetics 152: 1173). Même si ces événements de recombinaison sont relativement peu fréquents, leur impact peut être important à l'échelle de l'évolution notamment dans la sélection des espèces.

pages 76,77

## II. Analyse de la stabilité génétique des plantes transgéniques destinées à la commercialisation

### 1. ANALYSES MOLÉCULAIRES

#### 1 a. Méthodes

Pour analyser les plantes transgéniques à des fins d'homologation, il est tout d'abord procédé à des analyses par Southern blots afin de :

- ◆ déterminer le nombre d'inserts (sites d'insertions indépendants) ;
- ◆ déterminer le nombre de copies de l'ADN transformant (copies au même site d'insertion) ;
- ◆ caractériser les éléments génétiques insérés (chacun des éléments composant le vecteur de transformation) ;
- ◆ vérifier que les éléments du plasmide ayant servi à amplifier le vecteur de transformation ne sont pas transférés dans la plante ;
- ◆ vérifier la stabilité à travers plusieurs générations. Ces études sont basées sur la combinaison judicieuse d'enzymes de restriction et de sondes ADN (Figure 1).

FIGURE 1

Analyse	Sonde	Enzymes
◆ nombre d'inserts 	◆ plasmide complet	
◆ nombre de copies 	◆ plasmide complet	
◆ gène(s) et éléments génétiques (par ex promoteur)	◆ région(s) codante(s) ◆ chacun des éléments assurant la régulation	comme approprié
◆ vérification d'absence de régions du plasmide non transférées dans la plante	◆ Éléments de ces régions	comme approprié



Cette analyse est renforcée par le séquençage exhaustif des éléments insérés et de leur contexte génétique dans la plante :

- ◆ séquençage de l'insert, afin de déterminer la structure des protéines qui seront effectivement exprimées dans la plante ;

- ◆ séquençage des jonctions insert/ADN végétal, afin de pouvoir détecter la présence éventuelle de nouvelles séquences codantes résultant de la fusion entre l'ADN de l'insert et l'ADN hôte ;

- ◆ séquençage des régions entourant l'insert (+/-500 pb). Cette séquence va permettre entre autre la mise au point de méthodes de détection spécifiques d'une plante génétiquement modifiée donnée.

L'utilisation des techniques de PCR (polymérase chain reaction) permet de compléter la panoplie des études de caractérisation moléculaire. Elles permettent en effet de tester l'existence des séquences qui entourent l'insert dans les plantes non transformées, ce faisant confirmant leurs origines végétales.

### 1 b. Caractérisation moléculaire et stabilité

L'approche de base permettant de conclure à la stabilité d'un insert est le « finger print » en utilisant la technique de Southern. Il s'agit d'effectuer une étude comparant la structure de l'insert caractérisé initialement dans la plante et celle d'une partie de sa descendance. Pour les dossiers réglementaires, le nombre de générations testées est en général supérieur à sept (Figure 2).

FIGURE 2

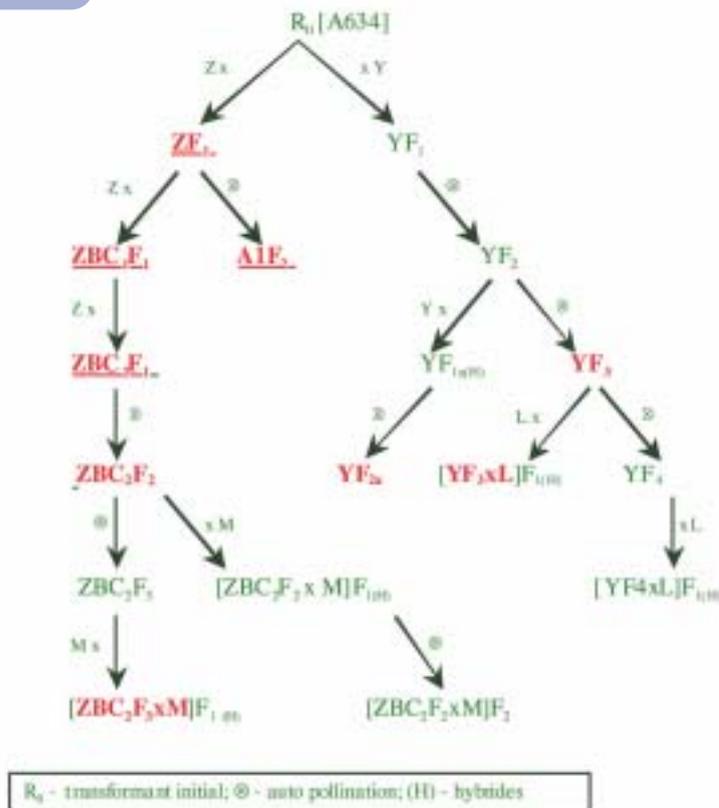


SCHÉMA RETRAÇANT UNE SUCCESSION DE CROISEMENTS IMPLIQUÉS LORS DE LA SÉLECTION D'HYBRIDES DE MAÏS. EN ROUGE SONT INDICUÉES LES ÉTAPES OÙ LA STABILITÉ GÉNÉTIQUE A ÉTÉ TESTÉE PAR SOUTHERN BLOTS. LES ÉTAPES OÙ DES ÉTUDES DE SÉGRÉGATIONS ONT ÉTÉ EFFECTUÉES SONT SOULIGNÉES.

## 2. ANALYSE DE STABILITÉ DES CARACTÈRES

### 2 a. Méthodes

Les caractères sont l'expression phénotypique des gènes introduits. La présence d'un caractère reflète la présence du (ou des) gène (s) concerné(s). La réciproque n'est pas automatiquement vraie, car l'absence d'un caractère ne signifie pas automatiquement l'absence du gène correspondant (cf. mécanismes de « silencing »). La détection d'un caractère peut être effectuée en se basant, soit sur la présence de la (des) protéine (s) qui le porte(nt) en utilisant des anticorps (études de type ELISA), soit directement sur l'activité de la (du groupe de) protéine (s).

### 2 b. Détection de caractères et stabilité

L'étude de la stabilité des caractères est effectuée à des fins réglementaires par Monsanto sur au moins cinq générations de plantes contenant l'insertion à tester. En fonction du caractère, les tests seront, soit de type ELISA, soit de type « mesure d'activité ». Des analyses statistiques de ségrégation des caractères d'une génération sur l'autre permettent de vérifier l'hérédité mendélienne des caractères.

## 3. INFORMATION COMPLÉMENTAIRE SUR LA STABILITÉ DES PLANTES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉES

En dehors du cadre réglementaire, des travaux de séquençage ont été conduits de façon indépendante par quelques laboratoires sur les régions chevauchant l'insert de certaines plantes génétiquement modifiées et l'ADN de la plante hôte afin de pouvoir développer des méthodes de détection. Ces recherches ont été, entre autre, effectuées sur les maïs MON 810 et NK 603, et le soja GTS 40-3-2. Ces études, bien que limitées, n'ont pas mis en évidence d'altération spécifique de structures qui pourrait être consécutive à l'introgession des caractères portés par l'insert dans des plantes autres que celles analysées par Monsanto (Windel et col., Eur. Food. Res. Technol. 213 : 107-112 ; Holck et col., Eur. Food Res. Technol. 214 : 449-453 ; Nielsen et col., Eur Food Res. Technol. 219 : 421-427 ; Hernandez et col., Transgenic Research 1153 : 1-11 , 2002 ; Matsuoka et col., J. Agric. Food Chem. 50 : 2100-2109).

A titre d'exemple, dans le cas de MON 810, les portions qui ont été re-séquencées couvrent 927 nucléotides sur l'extrémité 5' de l'insert dont 124 appartiennent à

l'insert et 803 au génome du maïs. Du côté 3', le séquençage couvre 1222 nucléotides, dont 624 appartiennent à l'insert et 598 nucléotides au génome du maïs. Ces séquences corroborent celles obtenues par Monsanto lors du séquençage complet de l'insert MON 810.

## III. Evaluation des risques associés à la recombinaison

Le risque est facteur de deux composantes, le danger d'une part, et la probabilité que celui-ci se manifeste, d'autre part. Pour évaluer les risques associés à la recombinaison, il est donc nécessaire d'identifier ces deux paramètres. Il est ensuite important de resituer ces paramètres dans leur contexte, c'est-à-dire la recombinaison des génomes de plantes en général.

### 1. DANGERS

Le seul danger potentiel imaginable qui puisse être associé à la recombinaison génétique dans les plantes génétiquement modifiées actuellement commercialisées, serait la formation de nouvelles protéines avec des propriétés toxiques ou allergènes. Cette formation de nouvelles protéines avec de telles propriétés ne pourrait *a priori* pas être le fruit d'une recombinaison homologue, car celle-ci est par nature conservatrice de la structure impliquée dans la recombinaison. De telles protéines pourraient, par contre, être éventuellement obtenues par recombinaison illégitime, dans la mesure où ce mode de recombinaison est susceptible de recréer à peu près n'importe quelle structure génétique dans le génome nucléaire, à partir de n'importe quel morceau d'ADN qui réside dans la cellule. La recombinaison illégitime peut donc toujours s'effectuer, qu'un insert soit ou non présent dans le génome. L'insert ne représentant qu'une infime fraction du génome (de l'ordre de  $10^{-4}$  % pour le maïs), la probabilité de production d'un polypeptide potentiellement toxique ou allergène au niveau d'un insert recombiné est donc extrêmement réduite, par rapport à celle qu'un tel événement arrive sur le reste du génome.

Par ailleurs, les éléments de l'insert sont bien caractérisés dans les dossiers d'homologation (ils sont certainement parmi les mieux caractérisés du génome de la plante considérée).

La toxicité potentielle de chaque protéine codée par l'insert est étudiée en détail. De plus, une étude complémentaire est effectuée au niveau des jonctions entre inserts et génome de la plante de façon à exclure que de nouvelles séquences, codant pour des polypeptides à propriétés toxiques ou allergéniques, se soient formées durant le processus d'intégration. Enfin, des études d'alimentation sont effectuées sur animaux, en utilisant la plante génétiquement modifiée et qui, en conséquence, intègrent le facteur de recombinaison.

Dans le cas des plantes transgéniques soumises à l'homologation et dont l'analyse de l'insert ne révèle aucune séquence codant pour de potentiels effets toxiques ou allergènes, le danger qu'une protéine à propriété toxique ou allergène se forme suite à une recombinaison impliquant des éléments de l'insert est donc tout au plus équivalent à celui impliquant une fraction du génome de taille similaire.

## 2. PROBABILITÉS

La fréquence des réarrangements liés à une recombinaison illégitime ou à une recombinaison homologue ectopique est très faible chez les plantes (voir introduction). Les études qui ont été effectuées (en utilisant comme modèle des insertions d'ADN, donc sur des plantes génétiquement modifiées) révèlent en effet des fréquences de l'ordre de  $10^{-8}$  pour des recombinaisons de type illégitime, ou des recombinaisons homologues entre éléments en position non-alléliques sur des chromosomes différents. Par ailleurs, des études de stabilité, effectuées à des fins d'homologation sur les inserts de plantes génétiquement modifiées et basées à la fois sur la structure de l'insert et sur son expression, ne révèlent aucune propension particulière à la recombinaison.

## 3. RISQUES

La quasi inexistence de dangers potentiels associés à la recombinaison pour des plantes destinées à la commercialisation, combinée à la très faible probabilité que les inserts puissent se recombiner de façon à créer de nouvelles protéines, indiquent que les risques liés à la recombinaison génétique pour des plantes génétiquement modifiées commercialisées ne sont pas différents de ceux existant pour les plantes conventionnelles « non modifiées génétiquement ».

## IV. Suivi des plantes génétiquement modifiées : le contrôle qualité

Les sociétés sont tenues de fournir leurs clients avec des semences de qualité constante, exprimant les caractéristiques attendues par les utilisateurs. Ceci est également vrai pour une société telle que Monsanto. Un agriculteur n'accepterait pas, ou ne rachèterait pas des semences qui auraient perdu le trait génétique sur lequel il comptait. A titre d'exemple, il suffit juste d'imaginer les conséquences inacceptables pour un agriculteur de perdre une partie de sa récolte suite à la disparition du caractère de tolérance à l'herbicide glyphosate. Le critère de qualité des semences vendues par les sociétés telles que Monsanto est donc essentiel, et pour le maintenir elles sont obligées de tester les lignées et les variétés de plantes transgéniques destinées à la commercialisation sur des bases systématiques de façon à garantir : leurs performances agronomiques ainsi que l'intégrité et l'efficacité du (ou des) caractère (s) introduits par génie génétique.

Ces tests sont effectués aux différentes étapes de la production : durant le processus d'introgession, au niveau des lignées parentales fixées, avant production commerciale, et au niveau des hybrides ou des variétés (test de l'efficacité aux champs, test de chaque lot commercial). Les méthodes appliquées sont basées soit sur l'ADN (PCR) soit sur la (les) protéine (s) exprimées(s), soit sur le caractère lui-même (tolérance à un herbicide, susceptibilité aux insectes ciblés).

## V. Conclusion

La recombinaison génétique est un processus naturel, peu fréquent et affectant l'ensemble du génome. Les plantes génétiquement modifiées destinées à la commercialisation subissent une caractérisation moléculaire approfondie de la structure et de la stabilité de l' (des) insert(s), ainsi que des propriétés des protéines exprimées par ces inserts. Ces études faites dans le cadre réglementaire, combinées aux connaissances actuelles que nous avons de la recombinaison génétique, permettent d'affirmer que les risques potentiels liés à la recombinaison génétique chez les plantes génétiquement modifiées et homologuées ne sont pas plus élevés que ceux attendus pour des plantes obtenues par sélection génétique conventionnelle.



## QUESTIONS DANS LA SALLE

**Marc FELLOUS**

Sur combien de générations portent vos analyses ?

**Bruno TINLAND**

En général, nous travaillons sur sept à dix générations, pas forcément successives. Cela dépend du type de la plante.

**Marc FELLOUS**

Nous avons dit hier que la création d'un hybride mobilisait des éléments répétés. On pourrait donc s'attendre à ce que la stabilité du génome en soit affectée. Avez-vous observé une instabilité génétique anormale sur certains de vos inserts ?

**Bruno TINLAND**

Autant que je sache, nous n'avons jamais observé d'instabilité génétique sur des événements commerciaux.

**Gilles-Eric SERALINI**

Vos dossiers réglementaires ont évolué au fil du temps. Aujourd'hui, sur combien de variétés différentes séquencez-vous l'insert ? Avant de mettre une variété aux champs, combien de générations testez-vous ?

**Bruno TINLAND**

Nous analysons systématiquement la stabilité des hybrides commerciaux. Lors de l'homologation, nous communiquons tous les éléments sur la stabilité dont nous disposons à ce moment. En général, nous étudions sept ou huit générations avant de soumettre un dossier d'homologation en Europe.

Concernant le séquençage, nous ne le faisons qu'une seule fois et les séquences que nous avons trouvées jusqu'à présent correspondent exactement à celles des plasmides que nous avons utilisés.

**Gilles-Eric SERALINI**

Vous ne faites donc la séquence qu'une fois, sur l'événement source.

**Bruno TINLAND**

Je crois que le séquençage est réalisé sur du matériel ayant passé à travers le processus de reproduction, donc sur un événement stabilisé. On ne peut pas exclure que durant les étapes de culture *in vitro*, le matériel somatique soit sujet à des recombinaisons dans l'insert. Cependant, en re-séquençant Mon 810, un laboratoire espagnol a trouvé exactement la même séquence que celle décrite dans le dossier d'homologation.

**Gilles SERALINI**

Un événement peut se produire après plusieurs générations. N'avez-vous jamais observé de mutations sur le long terme ?

**Bruno TINLAND**

Non, pas que je sache. Ce qui ne veut pas dire que comme pour toute les parties du génome d'une plante ceci ne puisse pas se produire.

**Ariane TOUSSAINT**

La première de vos conclusions (la recombinaison génétique est un processus naturel, peu fréquent et affectant l'ensemble du génome) me choque. La fréquence de la recombinaison génétique varie en effet selon les contextes. Une telle affirmation mériterait donc d'être nuancée.

**Bruno TINLAND**

Il est vrai que ma présentation ne portait que sur les plantes transgéniques ayant reçu une homologation, par sur la recombinaison génétique en général.

**Yves BERTHEAU**

Je précise que Mon 810 n'a pas été re-séquencé par le CECIC. Ils en ont juste étudié certaines parties afin d'élaborer des systèmes de détection.

Je souhaiterais par ailleurs savoir si les méthodes fournies dans le cadre du règlement 1829/2003 ont été testées sur une ou sur plusieurs variétés.

**Bruno TINLAND**

Ces méthodes de détection ont été utilisées sur plusieurs variétés. Nous avons d'ailleurs tout intérêt à disposer de méthodes de détection efficaces puisque nous les utilisons aussi pour nos contrôles qualité.



# SÉLECTION D'ÉVÉNEMENTS TRANSGÉNIQUES COMMERCIAUX : L'EXPÉRIENCE DE BAYER

**HENK JOOS**  
BAYER CROPS SCIENCE

## I. Le processus technique de sélection des événements Elite

Le processus de sélection commence par une transformation, réalisée à l'aide de techniques différentes selon les espèces. Pour la sélection des événements élite, nous travaillons généralement sur 50 à 300 transformants. Nous sélectionnons ensuite 10 à 20 événements, dont 3 à 5 seront considérés comme des événements élite potentiels. Parmi ceux-ci, nous choisissons alors un événement élite qui fera l'objet d'un dossier de mise sur le marché et qui sera utilisé comme lignée source dans nos programmes de sélection. Le processus de sélection est schématisé dans la Figure 1.

### 1. DÉFINITION

Un événement de transformation est une plante dans laquelle a été inséré un ADN exogène par génie génétique. Cet événement est caractérisé par la séquence d'ADN inséré mais aussi par la localisation de cet ADN dans le génome de la plante.

Ainsi deux événements de transformation différents peuvent comporter la même séquence d'ADN insérée mais différer par la localisation de cet ADN dans le génome de la plante.

Par sélection conventionnelle, l'ADN inséré dans la plante peut être incorporé (on parle d'introgession) dans différentes variétés de la même espèce. Ainsi, deux variétés différentes peuvent correspondre au même événement de transformation.

### 2. CRITÈRES DE SÉLECTION

Un événement ne doit compter qu'une seule insertion de transgène et aboutir à la présence stable d'une copie fonctionnelle de ce transgène. Il est testé sur une petite population sous serre ou en plein champ.

Pour un événement élite, il faut démontrer, lors de tests aux champs, que la performance du transgène d'intérêt correspond à la performance attendue pour sa commercialisation ultérieure. Il est également nécessaire, entre autre, de démontrer que l'insertion du gène n'a pas d'effet agronomique négatif, ni n'affecte les caractéristiques qualitatives de l'espèce. Nous réalisons généralement ces tests sur deux ou trois saisons, sur de grandes populations, sur différents génotypes et dans différents environnements.

### 3. INTROGRESSION DE L'ÉVÉNEMENT ÉLITE

Durant le processus de sélection d'un événement élite, nous engageons parallèlement un processus d'intégration dans différentes lignées représentatives de l'espèce. Ces lignées sont finalement utilisées comme matériel génétique pour réaliser un programme d'introgession plus large. Durant l'introgession dans les lignées récurrentes sélectionnées, nous utilisons des marqueurs moléculaires pour sélectionner des MBAS confèrentie (mbas team BBS NV+T. Robinson/M. Poe/R. Oberdoerfer/P. Dumont), événements où la recombinaison s'est déroulée de manière correcte, afin de reconstituer de manière optimale les parents récurrents sélectionnés.

### 4. TESTS DE STABILITÉ DE L'ÉVÉNEMENT ÉLITE

Un élément clé, lors de la sélection des événements élite, est de s'assurer de la stabilité génétique et phénotypique du caractère introduit. Nous réalisons donc une multitude d'observations sur l'expression des gènes de ces événements dès l'obtention en conditions de laboratoire, puis en serre et enfin au champ.

Nos analyses en serre, nous permettent d'éliminer les événements qui présentent une éventuelle instabilité phénotypique.

Il en est de même de nos tests aux champs qui permettent de travailler sur un très grand nombre de plantes.

Nous accompagnons ces observations par des analyses moléculaires à chaque étape de sélection de l'événement, de même que nous vérifions l'hérédité des gènes insérés qui doit être conforme aux lois de la génétique d'une génération à l'autre.

Seuls les événements présentant une stabilité phénotypique, génétique et moléculaire en serre et en champ sont retenus.

Pour conclure, nous sommes convaincus que notre processus de sélection des événements élite nous permet de ne sélectionner que des événements stables dans différents environnements, sur différentes lignées et sur plusieurs générations.

Les événements de transformation instables sont ainsi immédiatement éliminés.

Notre expérience nous montre que les événements stables constituent une bonne source d'insertion dans des variétés commerciales. Nous n'avons pas observé d'instabilité génomique, ni chez les inserts, ni dans les différentes lignées que nous avons développées.

## II. Le processus technique de sélection des événements Elite

La stabilité structurelle de l'ADN, introduit au moment de la transformation, est testée en utilisant plusieurs techniques moléculaires, sur plusieurs générations, dans différents environnements et sur différentes lignées. Nous utilisons des technologies de type Southern, ainsi que de type PCR.

Dans tous les cas, nous utilisons les résultats pour démontrer la stabilité moléculaire des événements. Voici quelques exemples d'analyses moléculaires :

### ◆ **LLCotton25**

Pour cet événement, nous avons étudié plusieurs lignées, sur différentes générations et dans différents environnements. Au total, nous avons analysé au minimum 25.000 individus et n'avons observé aucune instabilité.

Nous avons démontré, par Southern et PCR, la stabilité moléculaire de cet événement sur plus de dix générations et plus de dix lignées différentes.

Ceci est le cas des nouvelles variétés qui ont été lancées cette année aux Etats-Unis (un exemple d'analyse moléculaire est donné en figure 2).

### ◆ **Canola Rf3**

Cet événement a été commercialisé au Canada en 1998. En préalable à cette commercialisation, nous avons analysé plus de 100 000 plantes ou semences et n'avons jamais observé la moindre instabilité, que ce soit par Southern ou par PCR.

Aujourd'hui, ces analyses ont porté sur plus de 20 générations et 40 variétés. La pureté des hybrides démontre la stabilité de cet événement (Figure 3 pour un exemple d'analyse PCR).

### ◆ **Maïs T25**

Nous avons, là aussi, analysé plusieurs générations appartenant à plusieurs variétés dans différents environnements. Aucune instabilité n'a été détectée, y compris par PCR et Southern (Figure 4 pour un exemple d'analyse PCR).

Le séquençage de l'insert et des fragments de bordure dans la plante n'est pas effectué de façon systématique puisque d'autres analyses moléculaires permettent plus simplement de vérifier la stabilité génétique du caractère.

Ce séquençage est cependant réalisé de manière régulière que ce soit sur des proches du transformant original ou dans des générations éloignées.

Ainsi, le séquençage de l'insert correspondant à l'événement T25 a été effectué dans des plantes de générations +3 et +15 par rapport à la plante transformée initiale.

Pour RF3, des analyses analogues ont été effectuées sur des plantes de générations +4 et +20. Dans tous les cas, on a démontré que les séquences de l'ADN étaient identiques dans les différentes générations analysées.

### III. Conclusion

La stabilité phénotypique observée durant nos expériences est confirmée au niveau moléculaire.

Nous n'avons pas observé d'instabilité génomique dans les inserts des événements élite retenus pour la mise sur le marché.

Notre expérience montre que les méthodes PCR que

nous utilisons pour étudier la traçabilité ne sont pas rendues obsolètes par des mutations. Nous sommes en train de valider ces méthodes pour des utilisations plus générales.

L'analyse régulière de la qualité du matériel commercialisé permet de s'affranchir de tout autre facteur d'instabilité propre à chaque espèce végétale et qui n'est pas lié à l'insertion d'un transgène.

FIGURE 1  
1 GM trait R&D flowchart

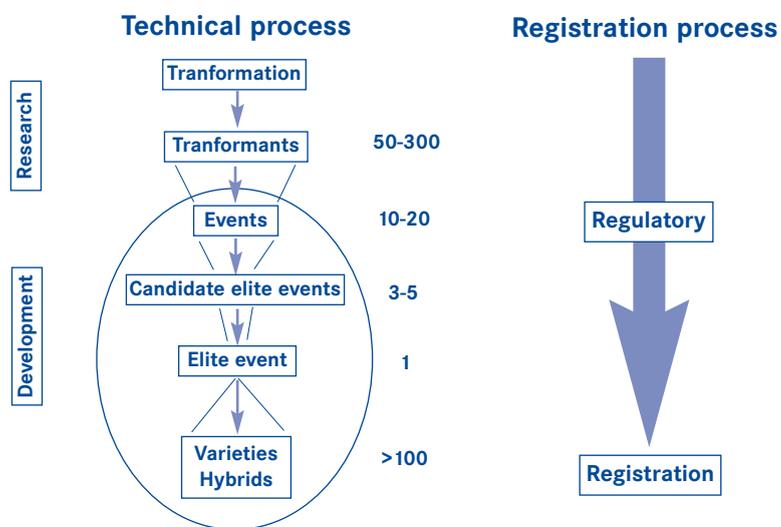


FIGURE 2

Overview of molecular stability testing of LL Cotton 25 event in different genetic backgrounds and in plants sampled from different environments using Southern hybridization

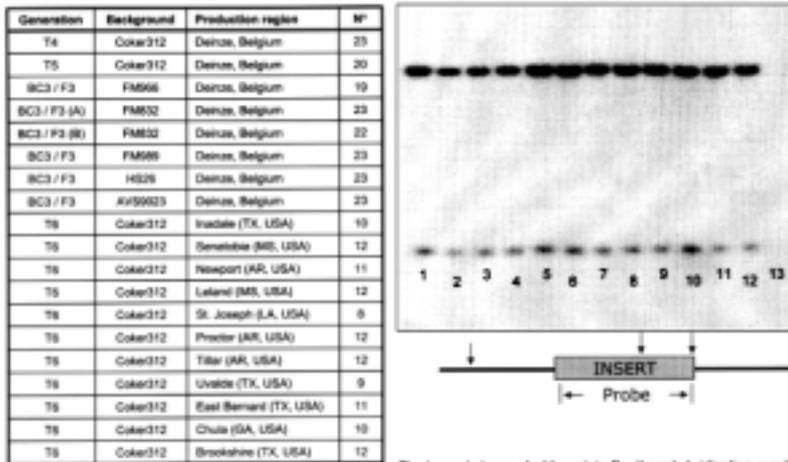
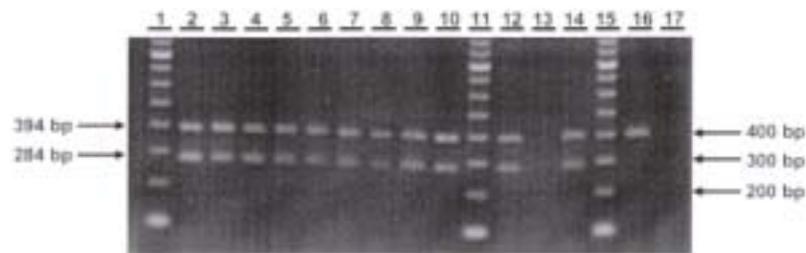


Table legend : overview of generations, genetic background and environments of LLCotton 25 containing plants tested for molecular stability

Fig. legend : Lanes 1 -11 contain Southern hybridization results of individual plants probed with a radioactive probe covering the LLCotton25 T-DNA insert. The plants were BC3/F3 plants in the recurrent parent FMS32 grown in a greenhouse in Belgium. Lane 13 is a negative control; lane 12 is a positive control.

FIGURE 3

Overview of molecular stability testing of the canola Rf3 event using event specific PCR methods



Control primers: CVZ7 – CVZ8 (394 bp)(Endogenous control gene)  
 Event primers: DPA127 – DPA128 (284 bp)(3' flanking)

- Lane 1. MW marker (100 bp ladder)
- Lane 2. Event Rf3 – In Australian recurrent parent
- Lane 3. Event Rf3 – In Australian recurrent parent
- Lane 4. Event Rf3 – In Australian recurrent parent
- Lane 5. Event Rf3 – In Canadian recurrent parent
- Lane 6. Event Rf3 – In Canadian recurrent parent
- Lane 7. Event Rf3 – In Canadian recurrent parent
- Lane 8. Event Rf3 – Canadian breeding line
- Lane 9. Event Rf3 – Canadian breeding line
- Lane 10. Event Rf3 – Canadian breeding line
- Lane 11. MW marker (100 bp ladder)
- Lane 12. Event Rf3 – European & Australian breeding line
- Lane 13. Event Rf3 – European & Australian breeding line
- Lane 14. Event Rf3 – European & Australian breeding line
- Lane 15. MW marker (100 bp ladder)
- Lane 16. Event Msil
- Lane 17. No Template Control (negative control)

FIGURE 4

Overview of molecular stability testing of the corn T25 event in different genetic backgrounds and different generations of introgression using event specific PCR methods



Protocol: ZMA-T25-01  
Ampol 5-DPA023 (T25) 352 bp  
CVZ16-CVZ17 (Endogenous control gene) 227 bp

**Fig. Legend**

Lane 1: T12 – 00ZM001180 ((T25xB73<sup>7</sup>)<sup>6</sup>) sample 1  
Lane 2: T12 – 00ZM001180 ((T25xB73<sup>7</sup>)<sup>6</sup>) sample 2  
Lane 3: T12 – 00ZM001180 ((T25xB73<sup>7</sup>)<sup>6</sup>) sample 3  
Lane 4: T12 – 00ZM001180 ((T25xB73<sup>7</sup>)<sup>6</sup>) sample 4  
Lane 5: T11 – 98ZM001591 ((T25xB73<sup>7</sup>)<sup>5</sup>) sample 1  
Lane 6: T10 – 98ZM000358 ((T25xB73<sup>7</sup>)<sup>4</sup>) sample 1  
Lane 7: T10 – 98ZM000358 ((T25xB73<sup>7</sup>)<sup>4</sup>) sample 2  
Lane 8: T10 – 98ZM000358 ((T25xB73<sup>7</sup>)<sup>4</sup>) sample 3  
Lane 9: 100 bp ladder  
Lane 10: S2 – TR3026 x TR1957 – B14, B73 x Mo17, lodent sample1  
Lane 11: S2 – TR3026 x TR1957 – B14, B73 x Mo17, lodent sample2  
Lane 12: S3 – TR3026LL x TR1984 – B14, B73LL x URNSS sample 1

Lane 13: S3 – TR3026LL x TR1984 – B14, B73LL x URNSS sample 2  
Lane 14: S5 – SGI822LL x TR4563 – B73, LancasterLL x Mo17, OH43, lodent sample 1  
Lane 15: S5 – SGI822LL x TR4563 – B73, LancasterLL x Mo17, OH43, lodent sample 2  
Lane 16: S6 – FR1064LL1.2 x FR2108 – B73LL1.2 x FR2108 sample 1  
Lane 17: S6 – FR1064LL1.2 x FR2108 – B73LL1.2 x FR2108 sample 2  
Lane 18: S7 – FR1064LL1.2 x FR9661 – B73LL1.2 x FR9661 sample 1  
Lane 19: S7 – FR1064LL1.2 x FR9661 – B73LL1.2 x FR9661 sample 2  
Lane 20: 100 bp ladder  
Lane 21: T25 positive control  
Lane 22: Wild type control  
Lane 23: No template control  
Lane 24: 100 bp ladder



## QUESTIONS DANS LA SALLE

### Gilles-Eric SERALINI

Vous ne nous avez pas bien expliqué comment on peut aboutir aux résultats présentés par Cécile Collonnier.

### Henk JOOS

Nous ne sommes pas d'accord avec les séquences publiques qui ont été démontrées.

### Gilles-Eric SERALINI

Elles ne correspondent pas à ce que vous avez déclaré.

### Henk JOOS

La seule chose que je peux dire, c'est que le résultat obtenu par l'équipe d'Yves Bertheau en séquençant la structure correspond exactement à ce qui est décrit dans nos dossiers. Cela confirme donc que les résultats figurant dans les dossiers d'homologation étaient totalement corrects. Le problème, c'est que les données publiques qui figurent dans les brevets – déposés parfois depuis dix ou quinze ans – ne correspondent pas nécessairement aux construits utilisés pour la transformation.

### Gilles-Eric SERALINI

A quel moment testez-vous vos événements aux champs ?

### Henk JOOS

Nous éliminons 60 % à 70 % des premiers transformants et ne testons aux champs que 30 à 50 d'entre eux.

### Gilles-Eric SERALINI

Leurs caractéristiques phénotypiques sont-elles claires lorsque vous les testez aux champs ?

### Henk JOOS

A ce moment, leurs caractéristiques phénotypiques ne sont pas forcément définies de manière très claire, mais nous voulons étudier leurs performances en plein champ car on ne peut rien conclure des résultats observés sous serre.

### Gilles-Eric SERALINI

Quel est, parmi les événements qui présentent des caractères phénotypiques mais qui ne sont pas stables, le pourcentage de ceux qui sont éliminés parce qu'ils

présentent une mauvaise insertion moléculaire ou des redondances ? Réalisez-vous une analyse moléculaire de tous ces événements ?

### Henk JOOS

Nous réalisons un Southern pour chaque événement, ce qui permet d'éliminer ceux qui aboutissent à deux ou trois insertions indépendantes dans le génome.

### Gilles-Eric SERALINI

Quelle est la proportion du nombre d'événements stables par rapport au nombre d'insertions ?

### Henk JOOS

Nous pourrions la calculer.

### Barbara HOHN

Vous avez dit ne pas avoir observé d'augmentation de l'instabilité des gènes. Qu'est-ce que cela signifie exactement ? A quoi vous êtes-vous référés pour établir cette comparaison ?

### Henk JOOS

Ce que je voulais dire, c'est qu'au moment où nous créons un événement, nous n'observons pas d'effets négatifs sur les autres gènes.

### Ariane TOUSSAINT

Vous parlez de stabilité, mais vous ne donnez jamais de chiffres. Sur quels critères un événement est-il considéré comme « stable » ?

### Henk JOOS

Pour l'élément Canola Rf3 par exemple, nous avons analysé 100 000 plantes et semences. On ne peut certes pas éliminer la possibilité de mutations ponctuelles sur certains gènes, mais nous n'avons pas observé de perte de fonction du gène restaurateur ou du gène de tolérance *Liberty* dans les populations que nous avons analysées.

### De la salle

Monsieur Tinland a mentionné dans sa présentation l'apparition de variants lors de la sélection d'une lignée et, dans le même temps, a souligné la stabilité de la structure des inserts. Quelle est alors la raison de l'apparition de ces variants ?

### Bruno TINLAND

Je n'ai pas dit qu'il y avait 5 % de variants mais que nous aurions été capables de détecter jusqu'à 5 % de variations par génération.

# INSERTIONS COMPLEXES AUX LOCI DES TRANSGÈNES DANS LE MAÏS

PERE PUIGDOMENECH

LABORATOIRE DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE VÉGÉTALE, ESPAGNE

## I. Introduction

En collaboration avec le professeur Casacuberta, notre équipe a publié voici quatre ans un article dans lequel nous avons dressé la liste des mécanismes contribuant à la fluidité du génome et des mécanismes de duplication des génomes, qui jouent un rôle très important dans l'évolution des espèces. Il s'agit essentiellement de :

- ◆ la polypléidie ;
- ◆ l'action des éléments mobiles ;
- ◆ la multiplication ;
- ◆ la recombinaison ;
- ◆ l'évolution des introns ;
- ◆ la mutation.

Ces différents mécanismes permettent d'expliquer la grande dispersion du génome des plantes et de comprendre comment des plantes peuvent survivre avec une quantité d'ADN très variable. Même s'il existe des colinéarités entre le génome des différentes espèces de céréales, nous savons aussi qu'elles se distinguent par d'importants événements de recombinaison.

Chez le maïs, l'une de ces recombinaisons fait intervenir une protéine structurale de la paroi, très fréquemment répétée et nous avons pu démontrer que, même parmi différentes variétés, il pouvait y avoir une variabilité au sein de cette protéine. Nous en avons conclu qu'il était important de bien comprendre ce phénomène quand on agit sur l'évolution des espèces. Il faut distinguer les événements qui se produisent à l'échelle évolutive de ceux qui se produisent à l'échelle historique. Ceux-ci sont surtout des mutations ponctuelles, des effets de recombinaison à des endroits très précis et des effets de la présence d'éléments mobiles. On peut trouver des événements de ce type, la sélection – naturelle ou humaine – leur permettant alors de se maintenir ou les faisant disparaître.

## II. L'exemple du maïs Mon 810

Nous avons publié l'année dernière un article portant sur le maïs Mon 810, dont la construction fait intervenir une protéine BT, un promoteur et un terminateur. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un projet de mise au point de méthodes de détection des variants. Nous avons réalisé un séquençage de ce maïs et avons pu mettre en place un mécanisme de détection par PCR quantitative et amplification de l'événement.

Les résultats ont également permis de démontrer des différences entre l'ADN ayant servi à transformer la plante et la séquence présente dans l'insert, mais aucune instabilité n'a été observée une fois l'événement réalisé. La même observation a été faite pour les plantes étudiées dans le cadre des programmes européens. C'est pour cette raison que les dossiers d'homologation doivent décrire la séquence des inserts et des zones cibles. Il a enfin été démontré qu'en cas de transformation, il pouvait y avoir des inserts multiples, même si le backcrossing utilisé pour transférer l'insert à une lignée élite peut permettre d'éliminer ceux qui ne sont pas désirables.

## III. Conclusions

Les sites d'insertion peuvent être multiples mais le backcrossing en élimine la plupart.

Les sites d'insertion peuvent être complexes mais ils peuvent être analysés.

Des changements peuvent se produire dans les transgènes mais leur stabilité peut être analysée par des méthodes de breeding standards et des contrôles de qualité. Nous avons des méthodes de détection moléculaire qui permettent de suivre l'évolution des variétés et nous savons que les événements qui peuvent affecter une lignée sont surtout des mutations ponctuelles qui, dans la plupart des cas, ont pour effet d'éteindre le phénotype.



## QUESTIONS DANS LA SALLE

### Henk JOOS

Dans vos conclusions, vous avez indiqué que l'on pouvait accepter des insertions multiples et qu'elles pouvaient être sélectionnées par backcrossing. Notre expérience montre qu'il vaut mieux avoir un site d'insertion défini lorsque l'on dépose un dossier d'homologation.

### Pere PUIGDOMENECH

La lignée qui fait l'objet d'un dossier d'homologation n'est jamais la première. En phase expérimentale, celle-ci présente généralement des inserts multiples qui sont ensuite éliminés par backcrossing. Mais il ne serait effectivement pas acceptable qu'une compagnie puisse demander une homologation pour une lignée présentant plus d'un insert.

### Catherine FEUILLET

D'après l'analyse de la lignée Mon 810, présentée hier, il manquerait apparemment une partie du gène dans les échantillons analysés.

### Pere PUIGDOMENECH

Les gènes synthétiques sont généralement fabriqués avec une protéine tronquée car cela s'avère plus efficace. Il convient donc de distinguer ce qui est tronqué volontairement de ce qui l'est involontairement.

### Marc FELLOUS

Quand on place un insert, quel doit être son degré de complexité minimale pour pouvoir affirmer qu'il est stable ? Peut-on accepter des mutations ponctuelles, des réarrangements sur les bordures, etc... ? Peut-on définir des risques minimaux ou maximaux ?

### Pere PUIGDOMENECH

Je ne crois pas que l'on puisse tirer de l'analyse des bordures la moindre conclusion sur la stabilité d'un

insert. Nous travaillons en effet sur des lignées dont le phénotype est stabilisé. Il pourrait d'ailleurs être intéressant d'analyser les événements qui se sont avérés instables.

### Marc FELLOUS

On demande à notre Commission de donner un avis sur la qualité de construction des OGM. Or ce n'est pas parce qu'une construction est complexe que l'on peut en déduire quelque chose pour le phénotype. On voudrait en fait que la construction soit la plus simple possible et que son expression soit stable dans le temps.

### Pere PUIGDOMENECH

L'analyse moléculaire ne permet effectivement pas de répondre à toutes les questions, notamment celles portant sur une éventuelle toxicité.

### Jean BERGER

Dans la construction complexe que vous avez montrée, certains fragments du gène BT étaient dispersés en amont du gène introduit. Ces fragments provenaient-ils du gène introduit où étaient-ils déjà présents dans le génome ?

### Pere PUIGDOMENECH

Lorsqu'un dossier d'homologation est déposé devant la Commission européenne, celle-ci reçoit des commentaires des différents pays membres. A partir des résultats de Southern blot sur un insert décrit dans l'un de ces dossiers, une équipe italienne a observé la présence de deux bandes, ce qui aurait pu résulter d'une insertion secondaire. Nous avons alors constaté que la taille de ces deux bandes correspondait à celle de l'insert et d'un fragment placé dans la région adjacente. On observe très souvent des événements de ce type.

### Henri DARMENCY

Il existe une variété de betterave résistante au Round Up dont l'un des inserts est fusionné avec un gène de la plante, produisant ainsi une protéine chimérique. Dans le cadre de la procédure d'homologation, la stabilité d'un événement de ce type, indépendant de celui qui conduit à la résistance, est-elle suivie sur plusieurs générations ?

## Pere PUIGDOMENECH

Je pense qu'un dossier de ce type qui montrerait la production d'une nouvelle protéine nécessiterait une analyse de toxicologie même si ces protéines ne sont généralement pas stables. L'analyse moléculaire permet également d'étudier la structure et l'expression de l'ensemble d'un insert. Pour notre part, c'est la structure de l'insert que nous analysons.

## Monsieur JOUDRIER ( AFSSA )

Vu nos pratiques d'analyse des plantes transgéniques, je pense qu'une construction qui présenterait une protéine de fusion serait immédiatement rejetée, du moins en France.

## Pere PUIGDOMENECH

Je comprends cette position, qui répond à un principe de précaution. Mais il faut tenir compte que beaucoup de ces protéines ne sont effectivement pas stables.

