



HAL
open science

”Nouvelles techniques” de modification des génomes et épigénomes (NTMGE)

Yves Bertheau

► **To cite this version:**

Yves Bertheau. ”Nouvelles techniques” de modification des génomes et épigénomes (NTMGE). Réunion Institut Technique de l’Agriculture Biologique (ITAB), Institut Technique de l’Agriculture Biologique (ITAB). FRA., Feb 2018, Paris, France. 80 p. hal-02785662

HAL Id: hal-02785662

<https://hal.inrae.fr/hal-02785662>

Submitted on 4 Jun 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.

“Nouvelles techniques” de modification des génomes et épigénomes (NTMGE)

Yves Bertheau

Réunion de l'Institut Technique de l'Agriculture Biologique
2018/02/07
Paris



MUSÉUM
NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE



INRA
SCIENCE & IMPACT



CESCO
Centre d'Écologie et des
Sciences de la Conservation



UPMC
SORBONNE UNIVERSITÉS

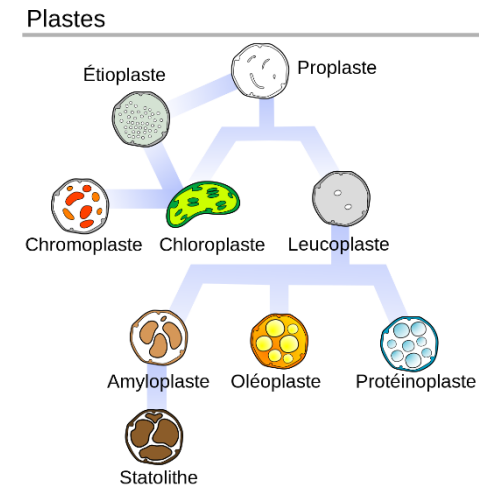
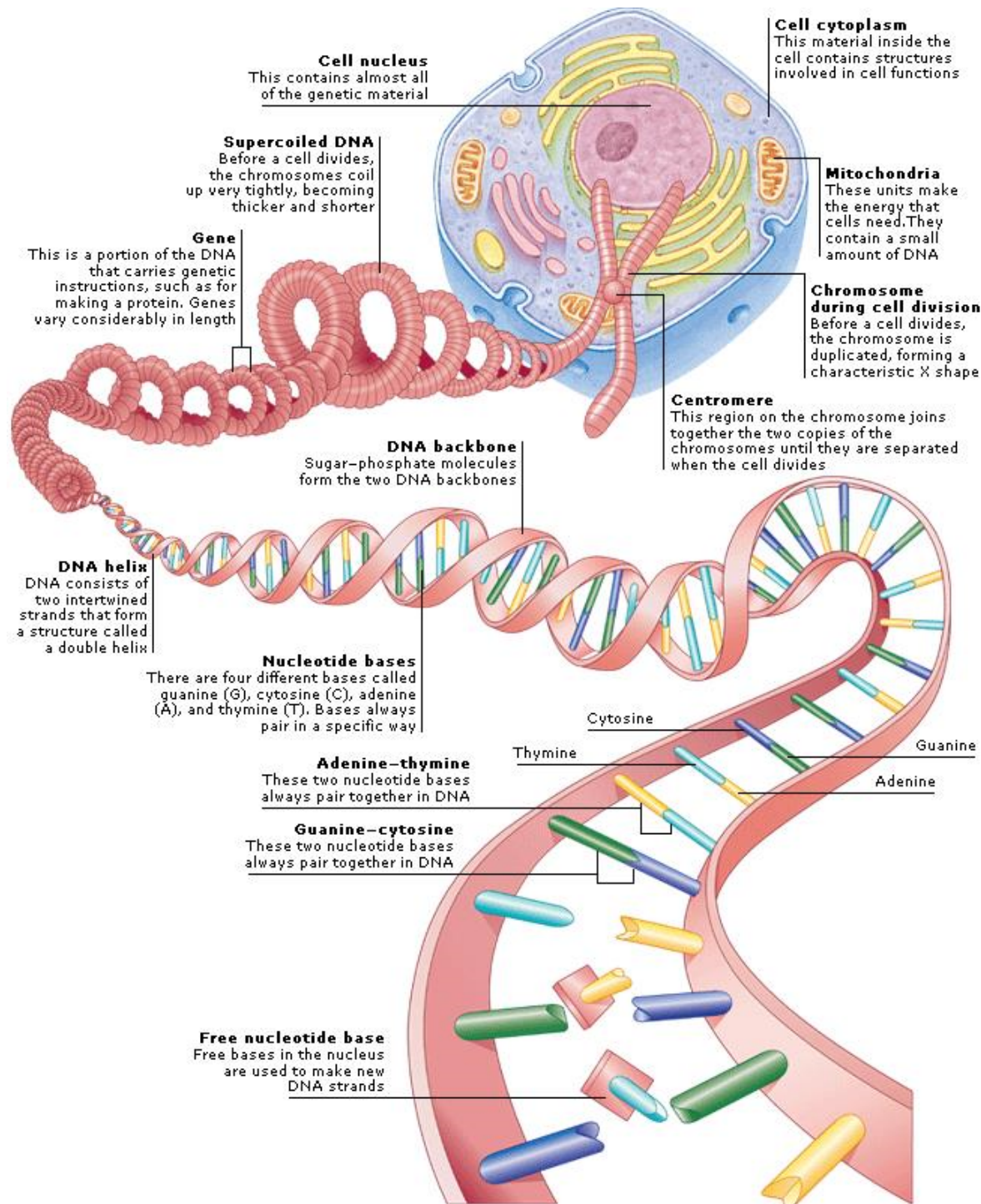
Une progression rapide des techniques

- Années 70 : apparition de la biologie moléculaire des procaryotes, avec quelques dogmes persistants sur-simplificateurs et surutilisés...
- Transferts horizontaux, analyses phylogéniques, séquençage,
- Années 80 : transformation des eucaryotes (Agrobacterium, micro-injection...)
- Années 90 : les OGM, OdM et méganucléases
- Années 2000: l'édition du génome (ZFN, ARN interférents, OdM) et l'épigénétique prennent leur essor...
- Années 2010 : TALEN, Crispr-endonucléases, l'épitranscriptomique, l'importance de l'organisation 3D voire 4D des noyaux / chromosomes...

Les NTMGE: une histoire mouvementée...

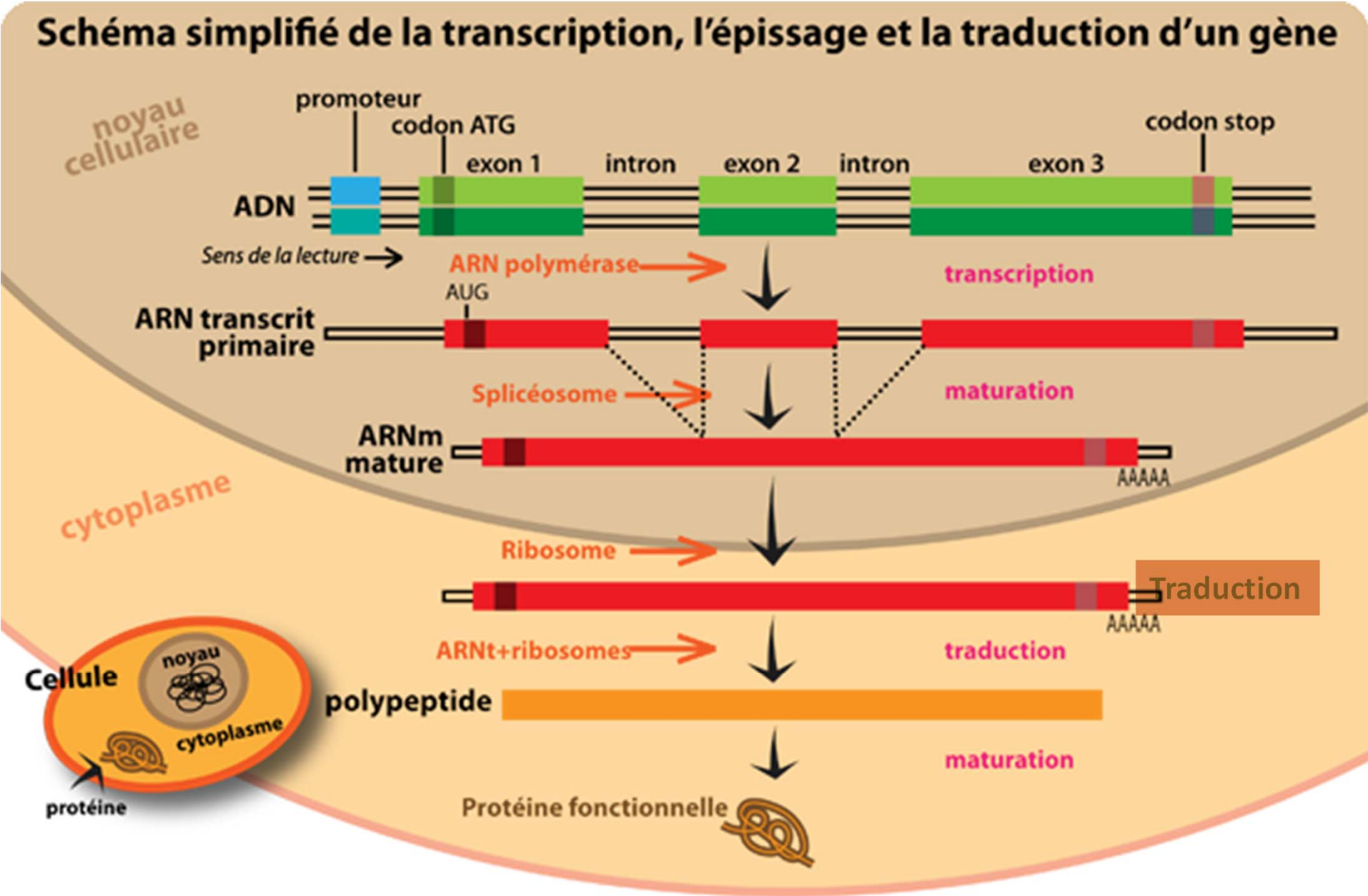
LA COMPLEXITÉ DU VIVANT

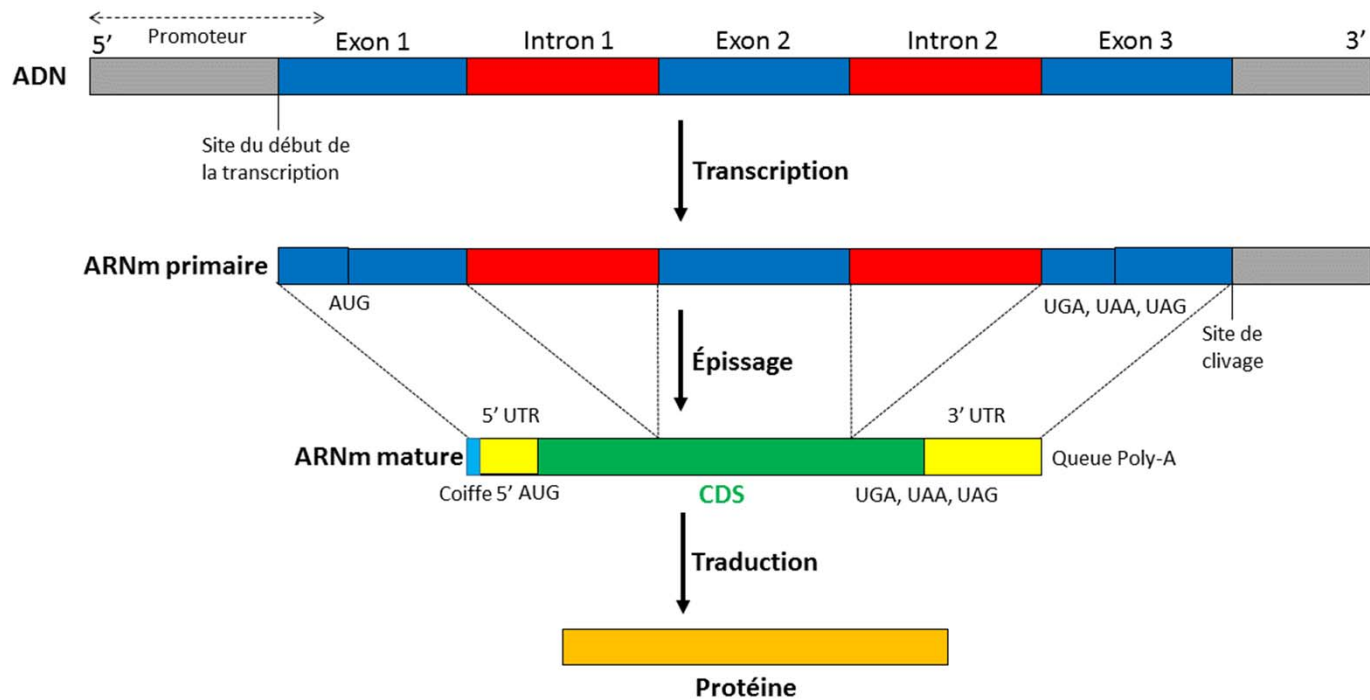
Du nucléotide à la cellule



La majorité des considérations porteront sur les noyaux des eucaryotes, pas les génomes d'organites (mitochondries, chloroplastes)

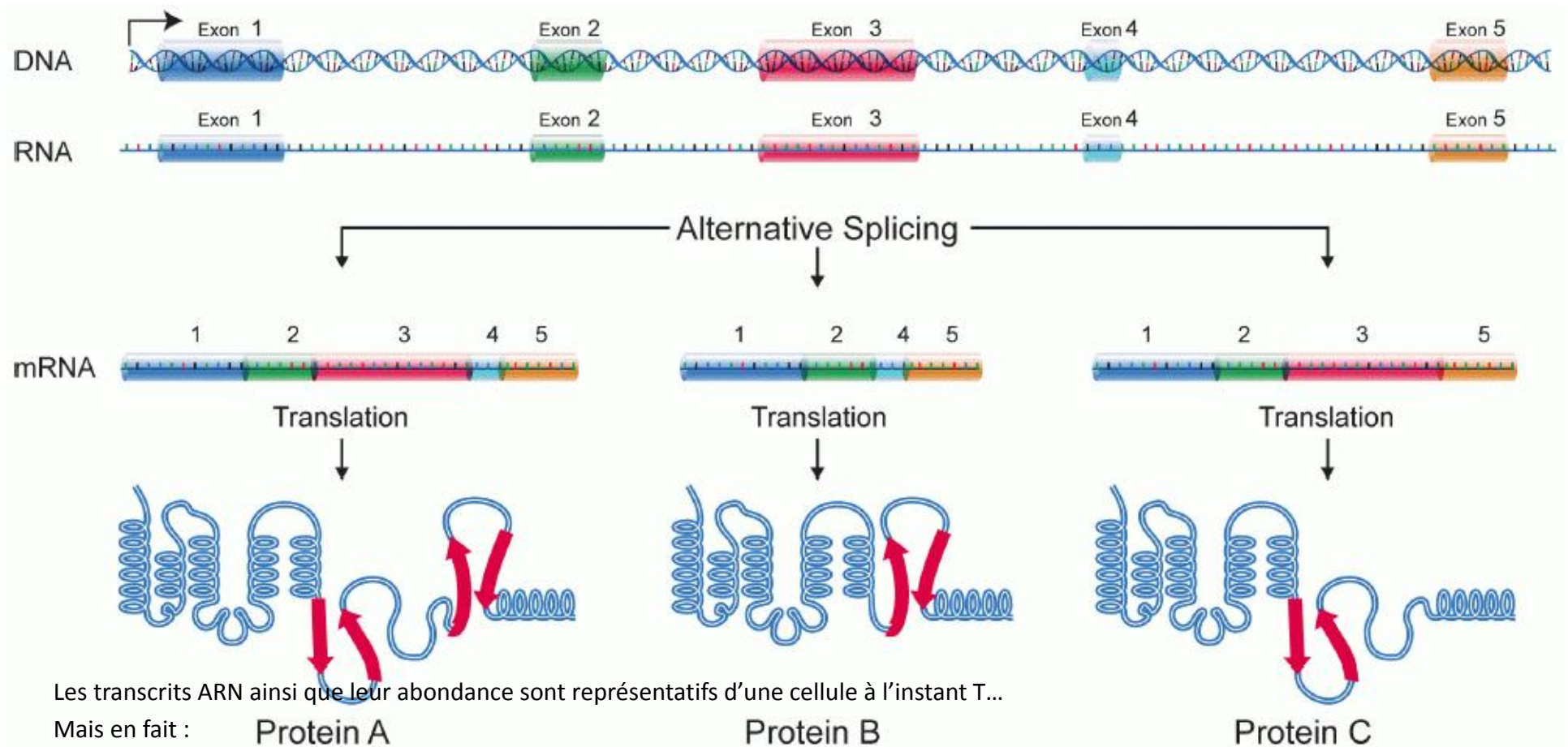
Schéma simplifié de la synthèse d'une protéine





Dogme central de l'épissage chez les eucaryotes...

« Dogme central de la biologie »: mais en fait...

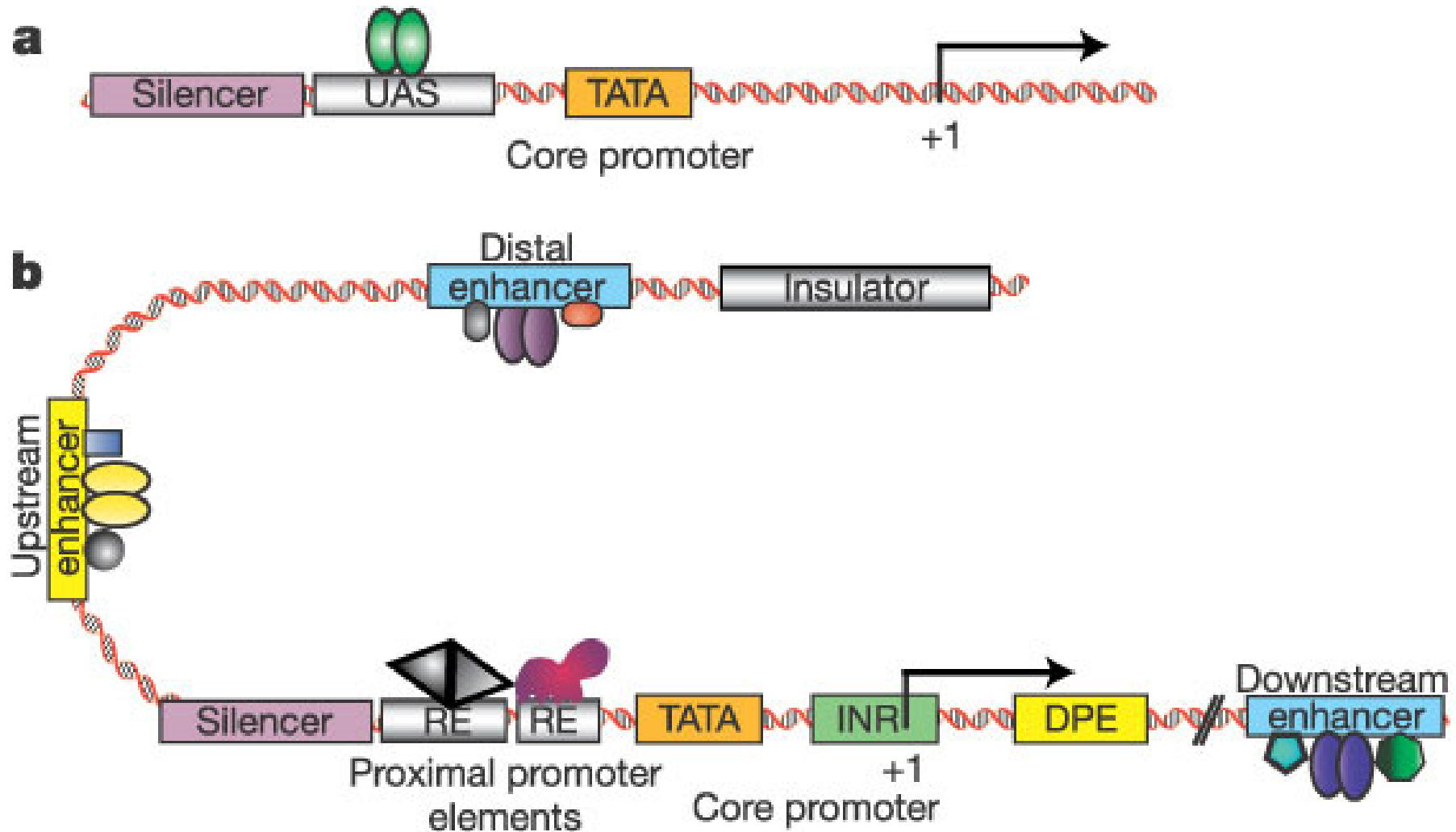


Les transcrits ARN ainsi que leur abondance sont représentatifs d'une cellule à l'instant T...

Mais en fait :

- L'épissage alternatif engendre de nombreuses isoformes, dont certaines pathologiques (cf. saut d'exon de la dystrophie musculaire de Duchenne)
- D'où différentes **abondances** pour divers transcrits, variables selon les tissus
- Le transcriptome est un mélange de transcrits de tous les gènes.
- Le transcriptome humain est constitué de dizaines de milliers de transcrits des 20-25 000 gènes (95 à 98% d'ADN non codant) pour plus de 100 000 protéines par cellule
- Des protéines « travaillent au noir » (moonlighting protein) avec une fonction (ex: enzyme) un temps puis une autre (ex: structurelle)...

Unité transcriptionnelle eucaryote: l'organisation spatio-temporelle compte

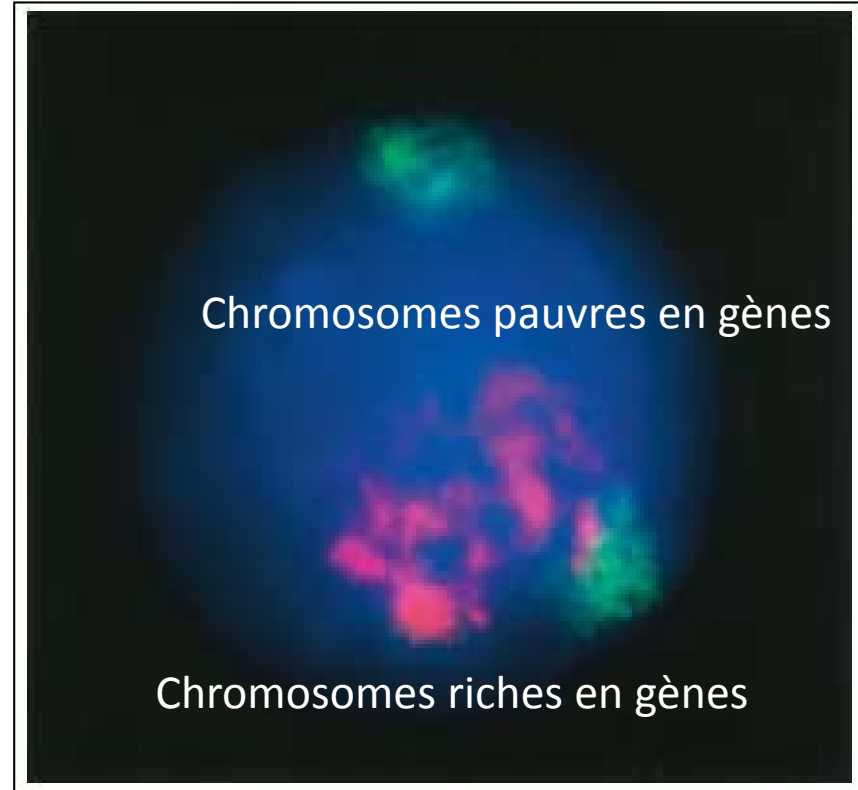


Organisation spatio-temporelle



Chromosome territories

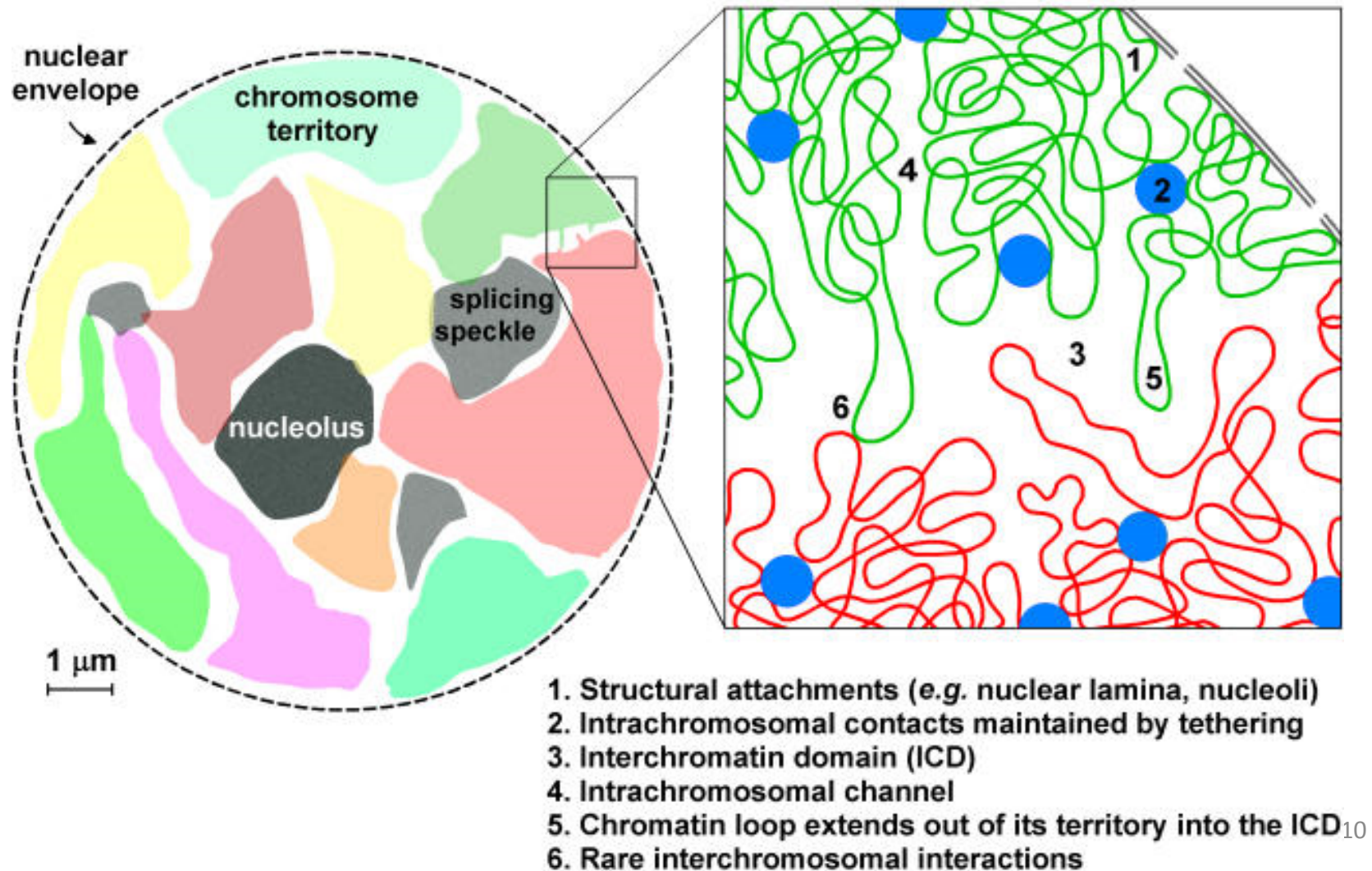
Schneider et al. 2007



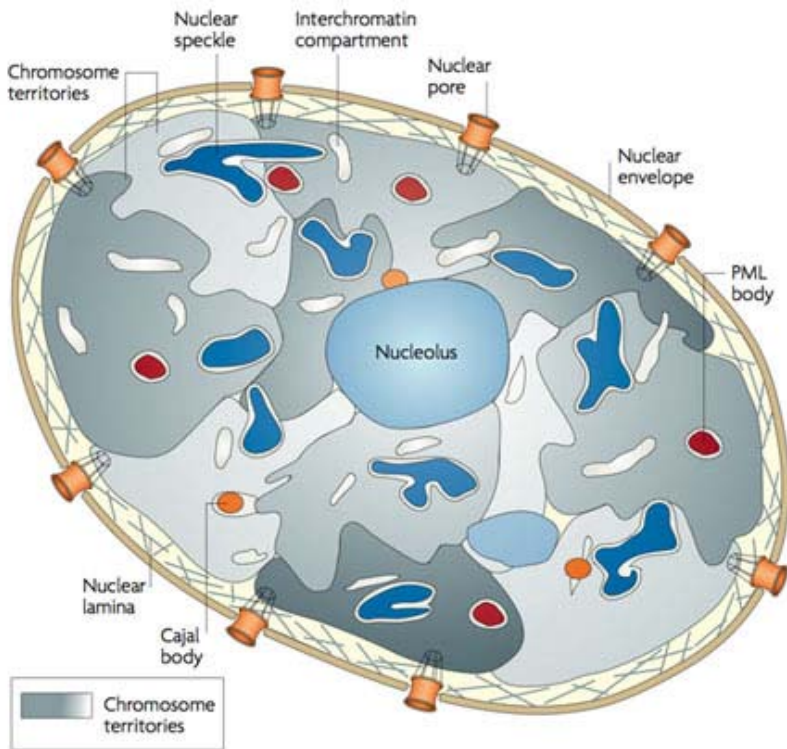
Spector et al. 2003

Organisation spatio-temporelle

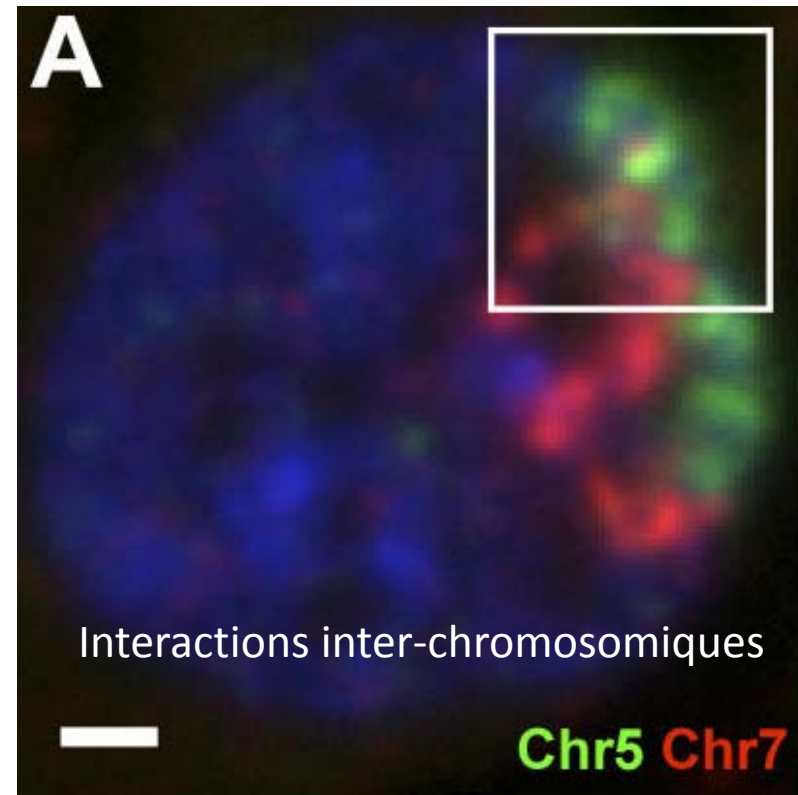
A. Interchromatin domain model



Organisation spatio-temporelle: domaines inter-chromosomiques (TAD)



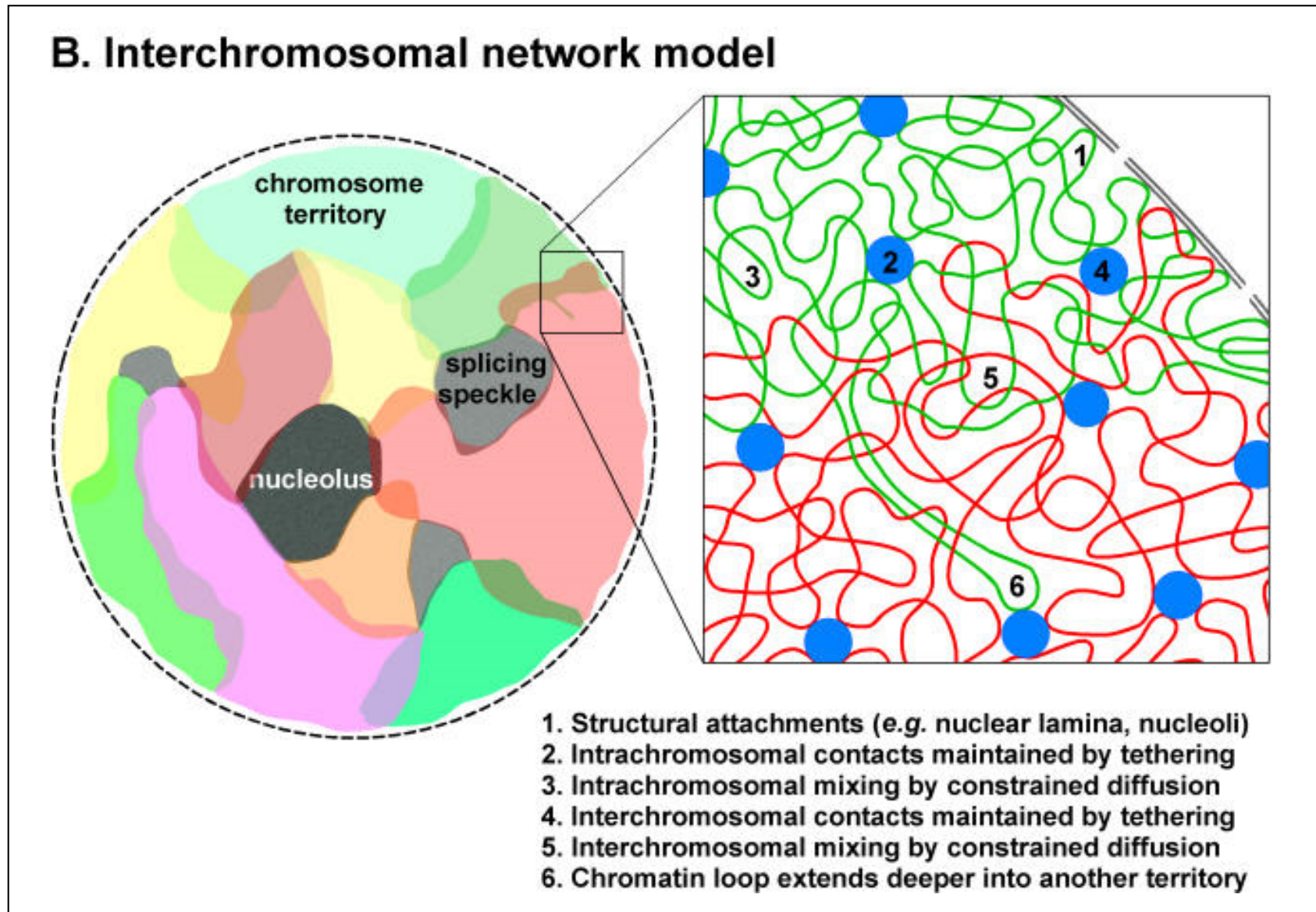
Schneider et al, 2007



Branco et Pombo, 2006

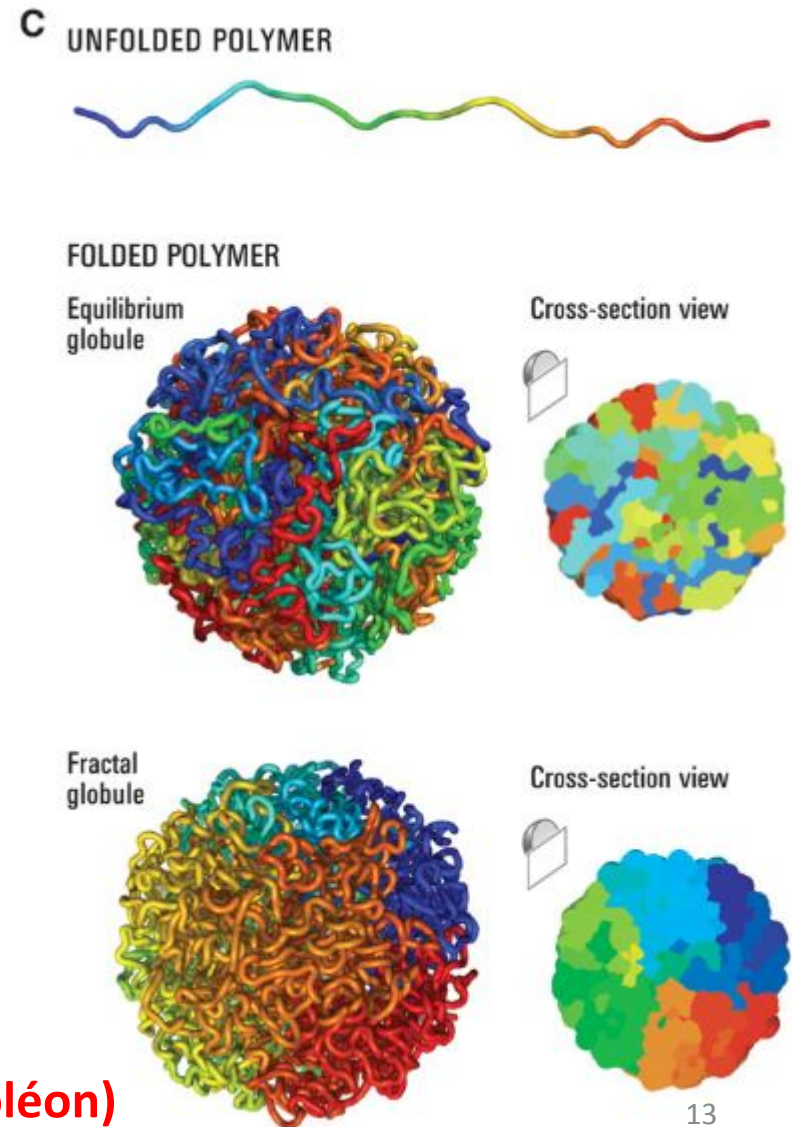
Synchronisation de gènes ? Co-régulation ?

Organisation spatio-temporelle: domaines inter-chromosomiques (TAD)



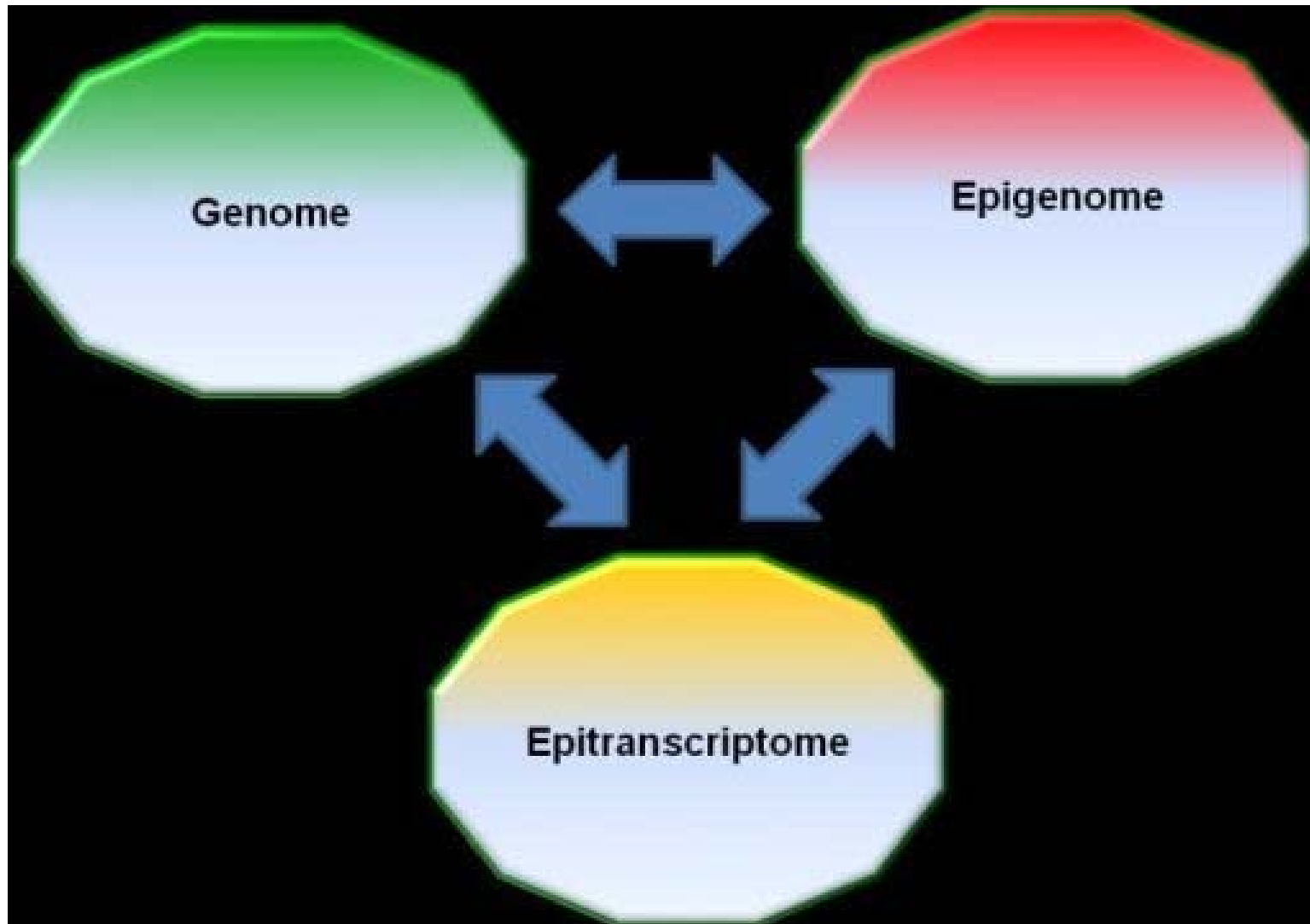
Rappel sur les génomes et épigénomes

- Très larges parts d'ADN non codant, ex: homme 95-98%, auparavant « junk DNA » dorénavant impliqué dans la régulation
- « Matière noire » (gènes « manquant »)
- Peu de corrélation entre régions linéaires et spatiales
- On est loin de la biologie moléculaire mécaniste et linéaire des années 70-80
- Épigénomes (ADN, protéines et ARN): on commence à savoir où commencer (cf. colloque EFSA Juin 2016)



Les organismes font tout pour préserver leurs génomes des mutations (ex. chêne Napoléon)

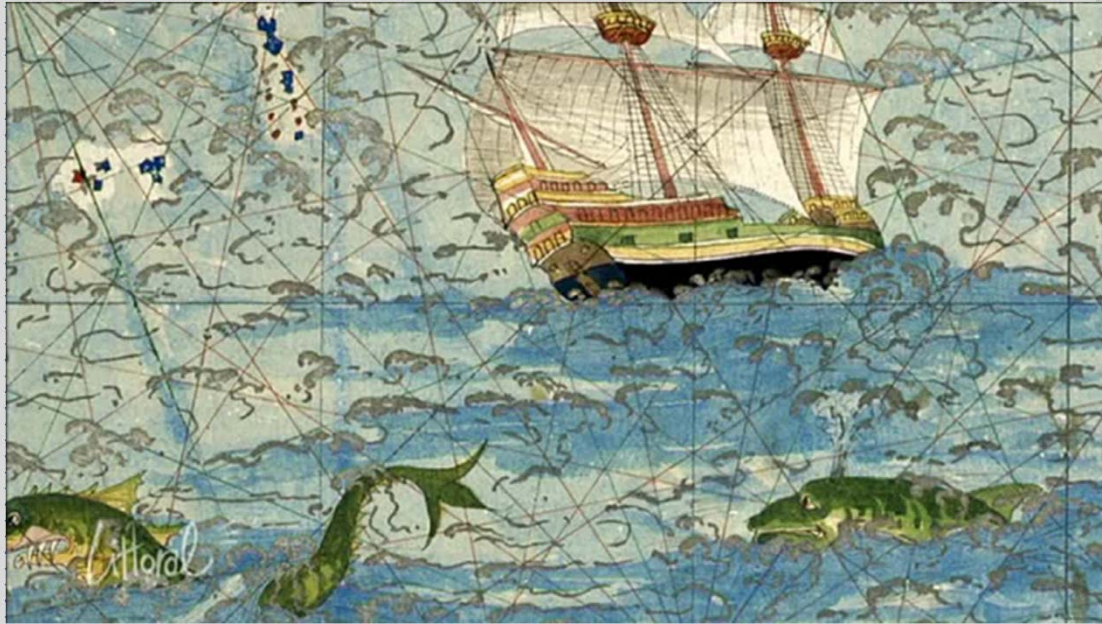
Interactions entre « domaines » encore très mal connus

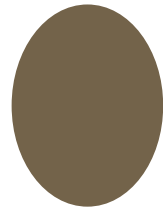
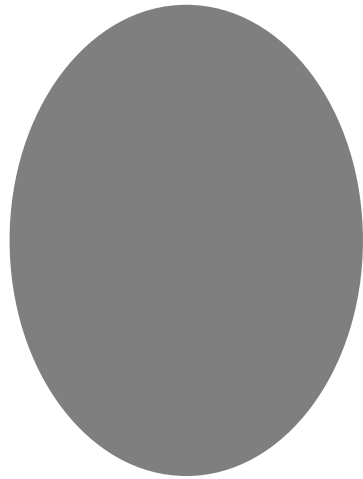


Circulation des informations : un monde à découvrir

- ADN et ARN circulent tant dans le sang, le placenta que les vaisseaux des plantes : sources d'information et d'expression de gènes dans des parties distales (dont porte-graffes-scions),
- Échanges d'acides nucléiques avec les plantes parasites, sources d'adaptation et de coévolution,
- ARN de nourriture régulent des gènes de l'animal la consommant,
- *C. elegans*: transports de petits ARN vers l'intérieur des cellules,
- Épimutations se transmettant sont prises en compte dans les programmes de sélection variétale, car pourraient expliquer l'hétérosis,
- Des micro ARN de plantes présents dans la gelée royale induisent, en passant dans l'hémolymphe, des changements de caste (création des reines d'abeilles),
- Des siARN de plantes modifiées induisent leur résistance à des insectes...

Conclusion: Terra incognita

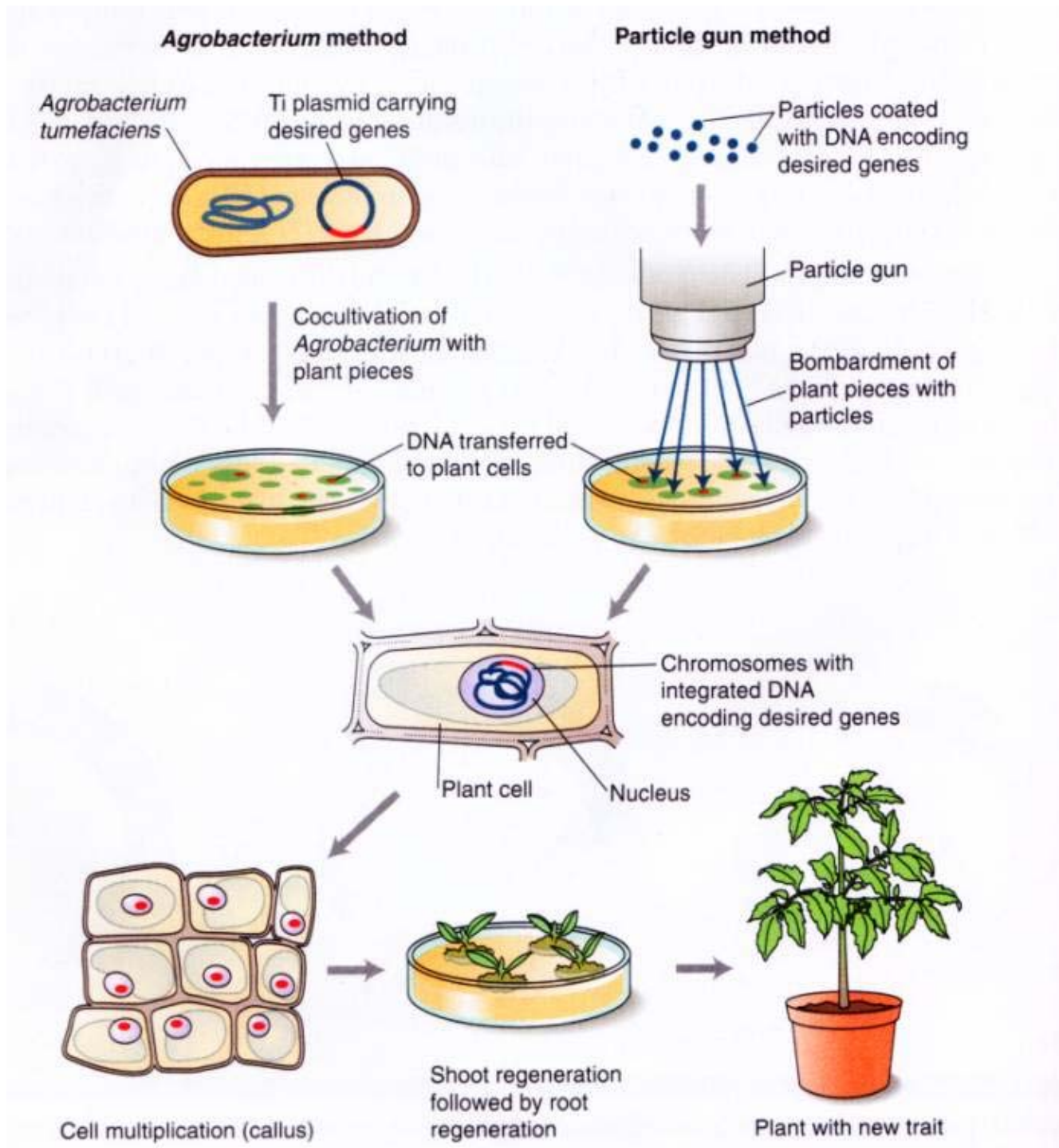




Mais comment
surviennent donc ces
fabuleux changements?



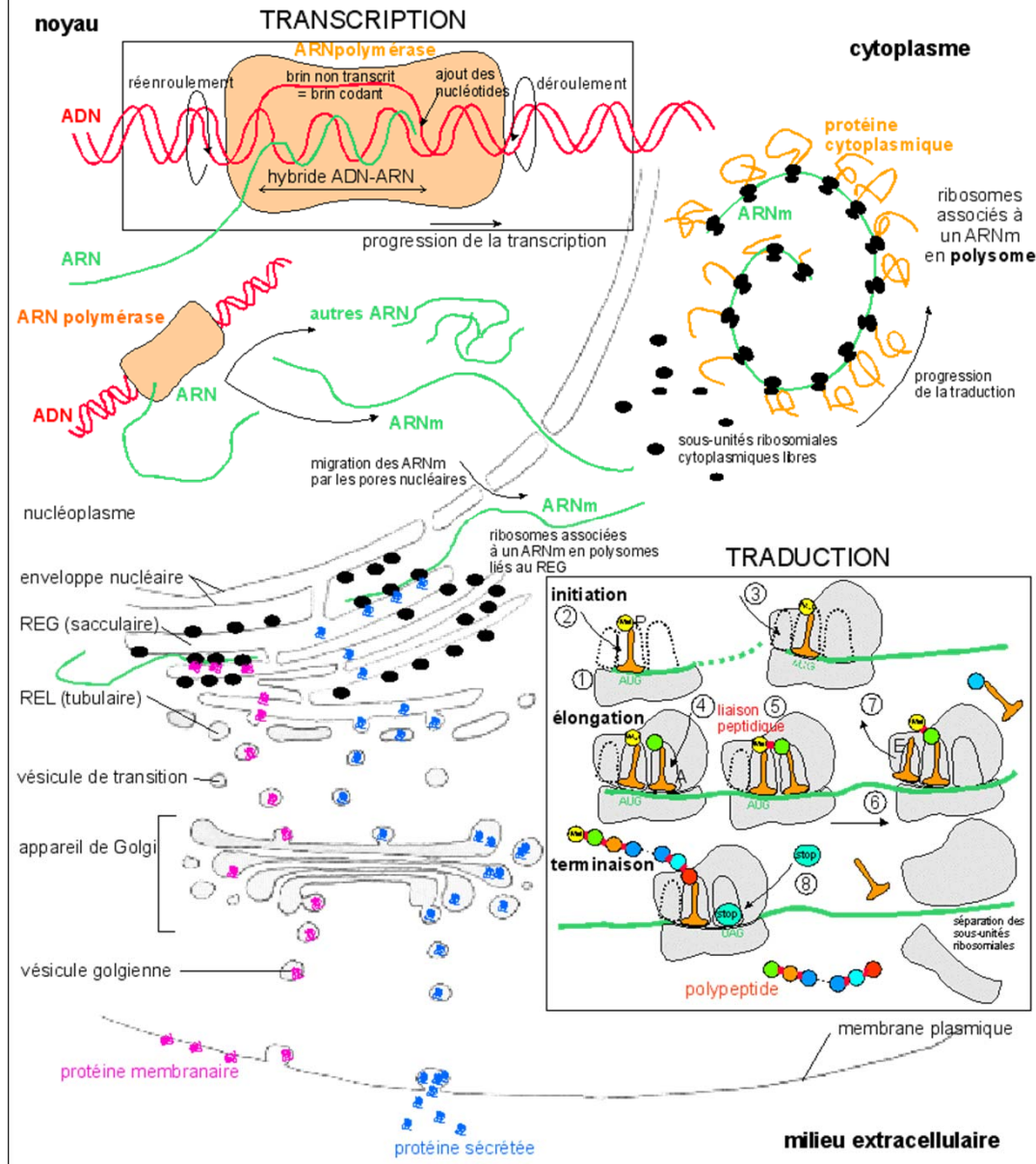
LES TECHNIQUES CONNEXES



Agrobacterium: bactérie phytopathogène avec de nombreuses infections avortées observées chez les Végétaux (ex: patate douce)...

Une régénération de plantes limitée à quelques espèces: peu d'espoir d'agrandir le cercle des élues au vu des coûts de développement, des retours sur investissements tardifs et du peu de considérations pour les publications...

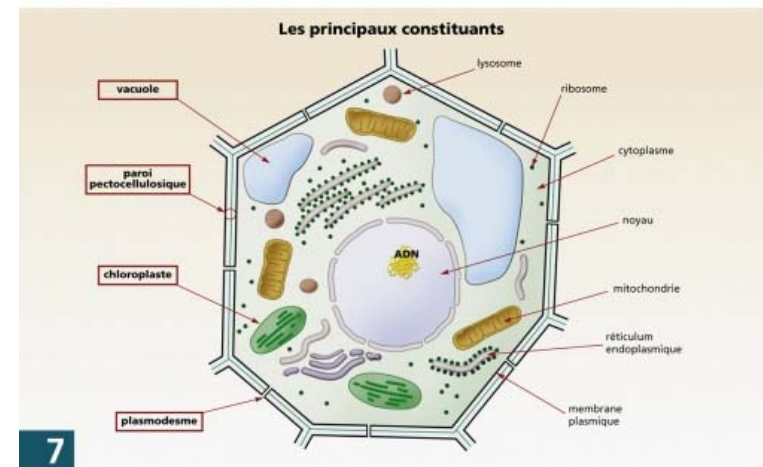
Comment les différents compartiments cellulaires participent à la synthèse des molécules produites lors de l'expression de l'information génétique



Les différents compartiments cellulaires affectés par les techniques connexes : membranes...



La cellule végétale



Techniques connexes

Les NTMGE nécessitent le recours aux « vieilles techniques » utilisées pour la transgénèse des OGM déjà commercialisés:

- protoplastisation, vectorisation (très grosses protéines, restes de génome et de plasmide d'*Agrobacterium...*), cultures cellulaires, systèmes de sélection des cellules modifiées, régénération des plantes non récalcitrantes (d'où un spectre toujours limité d'espèces):
- Toutes techniques stressantes inductrices de mutations et épimutations (jusqu'à 35% pour les cultures cellulaires)
 - mal repérables (logiciels et génomes de référence fiables manquant) car souvent mutations ponctuelles ou indels, surtout dans des régions répétées ou non codantes, problèmes des translocations et inversions...
 - Difficilement éliminables (rétrocroisements par les firmes en nombre insuffisant, co-ségrégations selon les caractères, régions à hérédité non mendélienne) laissant des millions de pb non « apurés » et peu / mal contrôlables (cf. point logiciels et génomes de référence)

Colloque à Londres en Octobre 2016 : laboratoires recherchent désespérément bons chefs cuisiniers bien entraînés et regrettent le manque d'écoles pour former les futurs « chefs »...



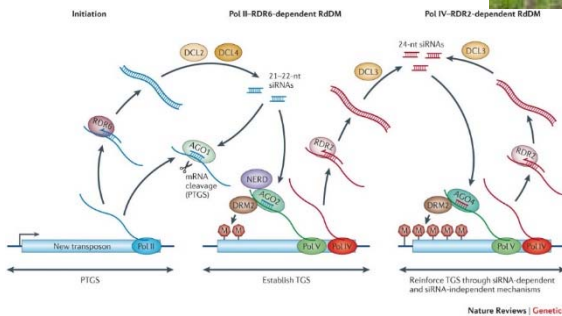
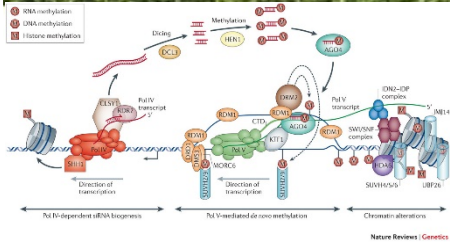
Conventional Apple Variety



Arctic® Apple Variety



A comparison of corn with disease and Bt corn. (Photo by Biotech info center)



LES TECHNIQUES NTMGE

Le travail communautaire initial sur les NTMGE

- Zinc finger nuclease technology (ZFN1-ZFN3) + TALEN+ meganucleases
- Oligonucleotide directed mutagenesis (ODM)
- Cisgenesis/ Intragenesis vs. Transgenesis
- RNA-dependent DNA Methylation (RdDM)
- Grafting (GM rootstock / scion)
- Agro-infiltration (Agro-infiltration “*sensu stricto*”, Agro-infection, Floral-dip i.e. plant transformation)
- Reverse breeding
- Synthetic biology

Un groupe de travail 2007-2012

Rapport pas rendu public

Mais commenté pour des aspects « positifs » (ex: JKI)



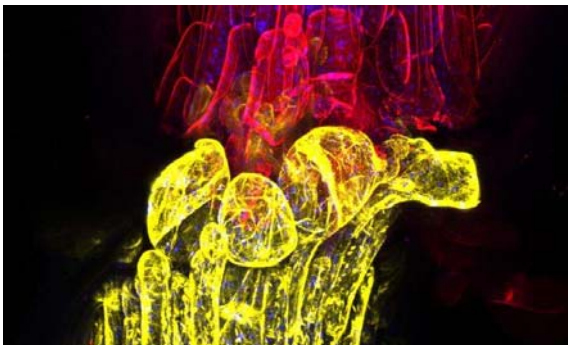
Crispr-Cas9 et consorts

Greffes: interactions entre scion et porte-greffe

- pathogènes, protéines (e.g. Cry1Ac), ADN, ARN, hormones... circulent
- Régulation d'expression (silencing...), synthèse de protéines dans les scions,
- Les génomes communiquent entre eux avec constitution d'épialleles <http://phys.org/news/2016-01-grafted-genomes.html#jCp>

Les produits du scion non OGM (ex: fruits) ne peuvent donc être considérés comme non influencés par le porte-greffe OGM

Credit: Charles Melnyk/University of Cambridge



Sam van Aken, Syracuse University, New York.



CRISPR

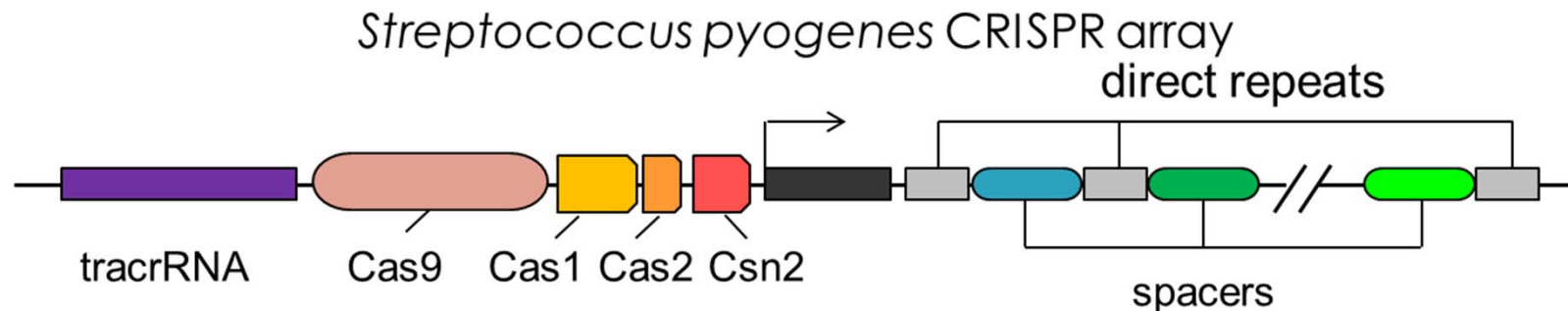
(6 classes, 19 sous-classes aux fonctions peu ou totalement inconnues)

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Une « immunité adaptative acquise » des bactéries contre les phages
Décrite dès 1987, adaptée pour l'édition du génome en 2012, et les eucaryotes en 2013

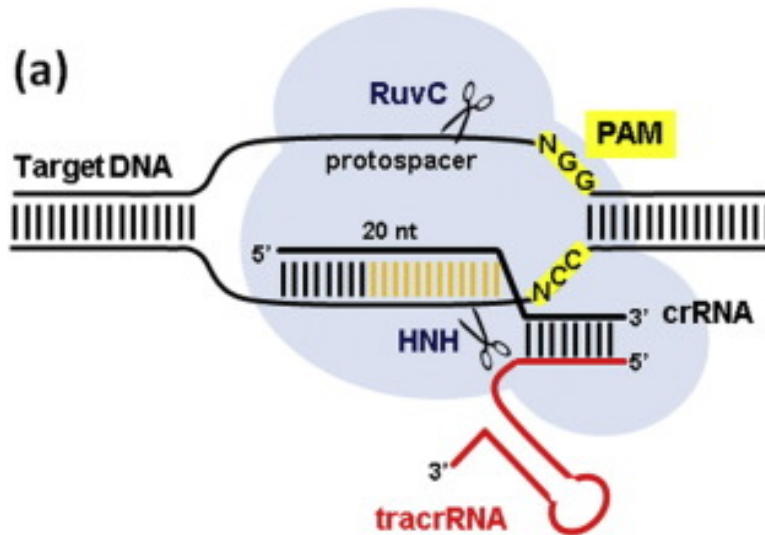
Convergences évolutives chez les animaux et les plantes avec des systèmes de stabilisation des génomes ex: ARNpi et éléments transposables, petits ARN et DICER...

Objectif fondamental : lutter contre les ADN invasifs

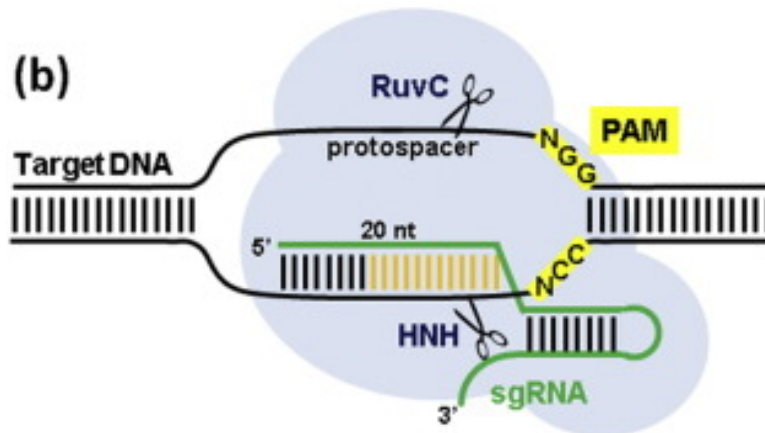


Crispr-Cas9/endonucleases: modifications des génomes et épigénomes

naturel



artificiel



Limitations d'action dans les génomes par les séquences PAM d'où une recherche d'autres nucléases avec d'autres PAM ex: Cas9, C2c1, Cpf1 (1 seul ARN); apporter son PAM...

Limitations de taille d'insertion d'où problèmes par ex: homme

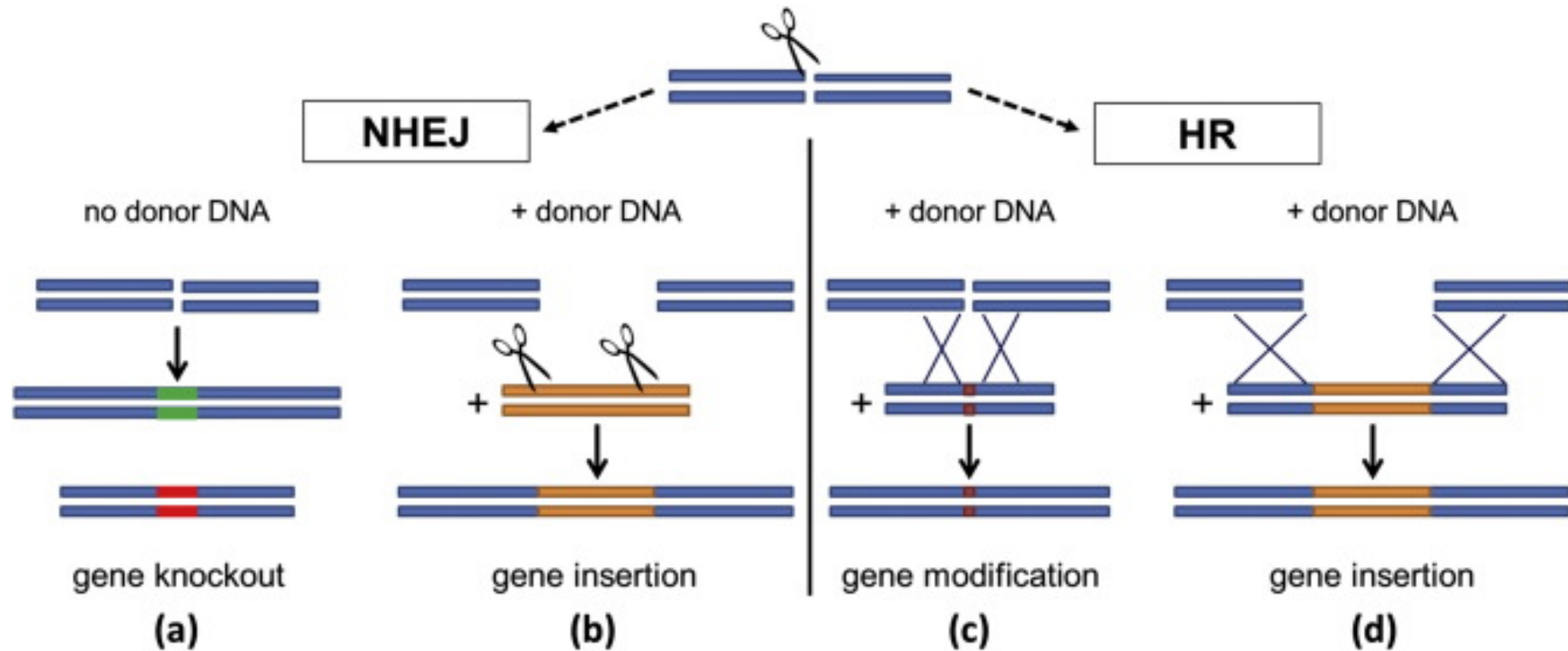
Effets non intentionnels:

- Off targets car SDN = sequence directed mutagenesis (homologies de séquences)...
- Sauts d'exons

Tentatives de réduction des off-targets par modifications -> activité nickase, réduction des quantités de réactifs, durée, RNP,

C2C2 (Cas13a) et RCas9 modifications de l'ARN...

NTMGE: systèmes de réparation d'ADN double brin de base



High frequency
Canonical and alternatives (MMEJ)

Low frequency

Nombreuses mutations au hasard à l'origine par exemple de cancers

Genome editing with site-specific nucleases. Double-strand breaks induced by a nuclease at a specific site can be repaired either by non-homologous end joining (NHEJ) or homologous recombination (HR). (a) Repair by NHEJ usually results in the insertion...

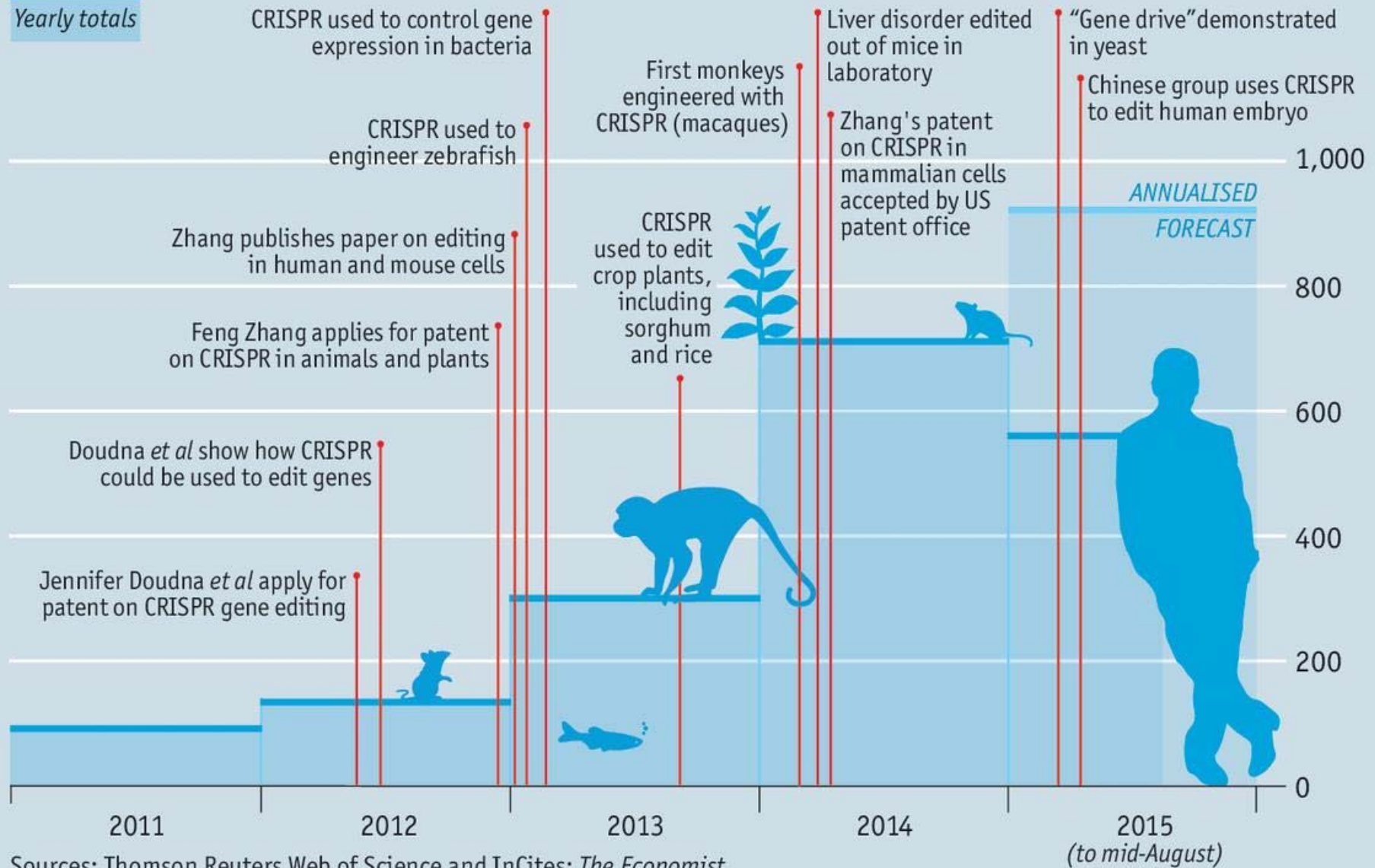
Luisa Bortesi, Rainer Fischer Biotechnology Advances, Volume 33, Issue 1, 2015, 41–52

Crispr-endonucléases: un ensemble de produits et techniques en vogue...

Stepping up

Number of CRISPR papers published and some research highlights

Yearly totals



Sources: Thomson Reuters Web of Science and InCites; *The Economist*

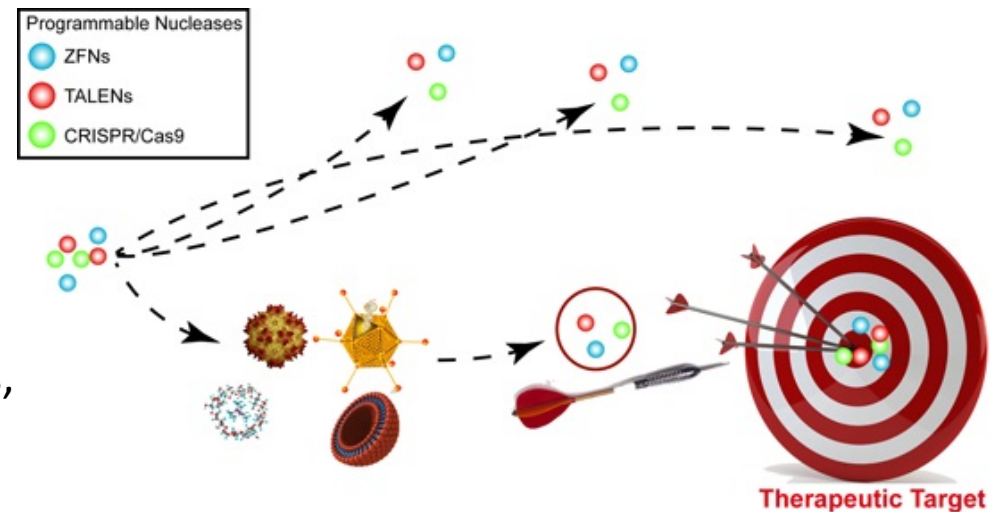


Problème de spécificité: les off-targets

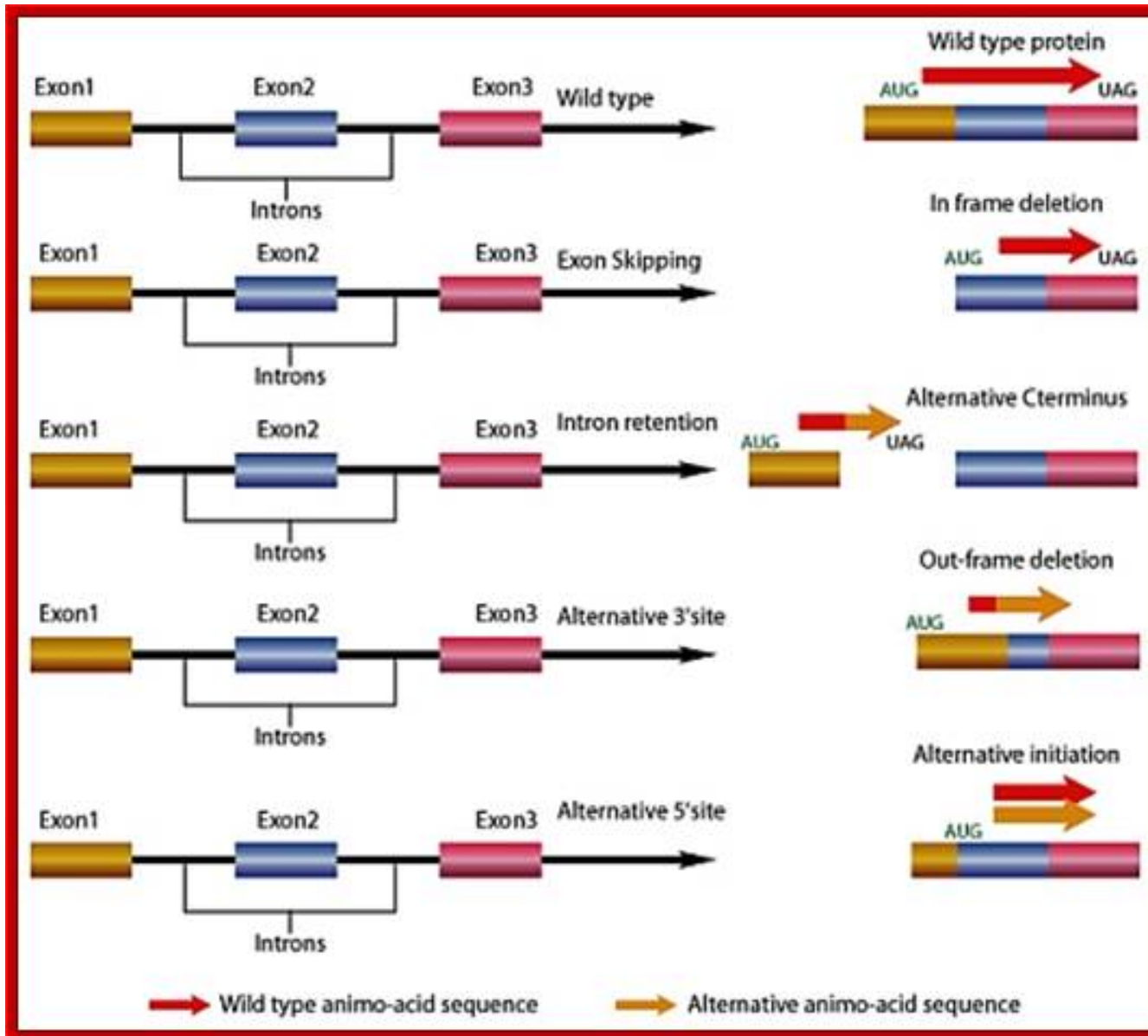
D'abord s'entraîner...

Ensuite se lancer....

- De nombreuses homologies totales ou partielles dans le reste du génome
- Des considérations thermodynamiques
- En conséquence : des insertions / délétions ponctuelles ou non, des réarrangements chromosomiques (inversions, translocations...)

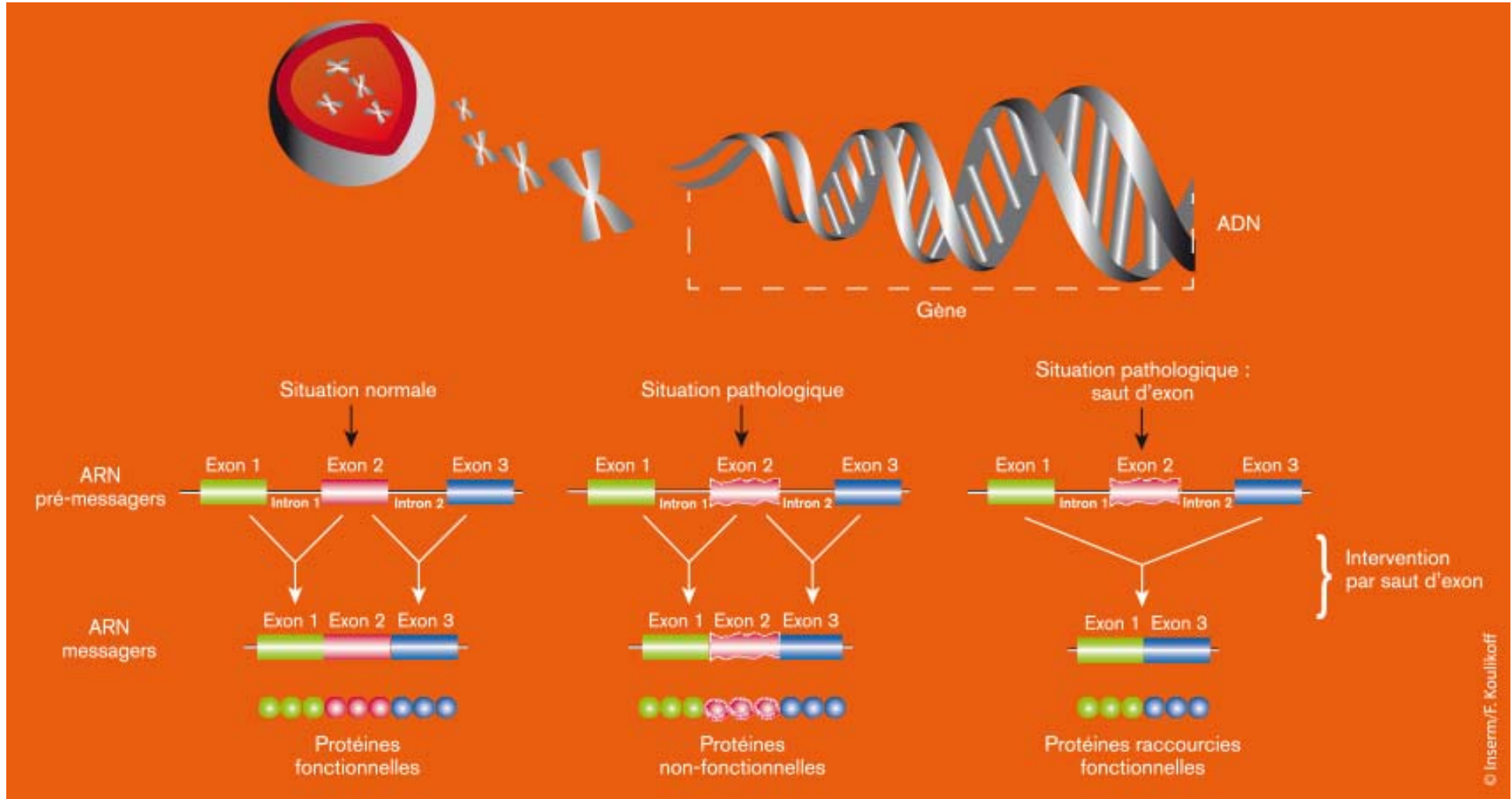


Autre problème : les sauts d'exon



- Source de nombreuses maladies (cf. Duchenne)
- Observé comme effet non intentionnel pour crispr-Cas9

Saut d'exon: protéines fonctionnelles ou non fonctionnelles, pathologiques ou pas



**ELIMINATION DES MUTATIONS
ÉPIMUTATIONS, OFF-TARGETS...**

« Compte tenu de la complexité des interactions entre mutations, Craig Venter estime qu'il faudrait séquencer 10 millions d'individus pour identifier la quasi-totalité de la composante génétique des maladies et de nos caractéristiques phénotypiques. Son programme de séquençage devrait dépasser 1 million d'individus par an, pour lesquels il dispose d'un dossier médical électronique de grande qualité, grâce à un accord avec des assureurs santé. Le but avoué est de créer un logiciel permettant d'optimiser la prise en charge des patients et d'augmenter leur espérance de vie. »

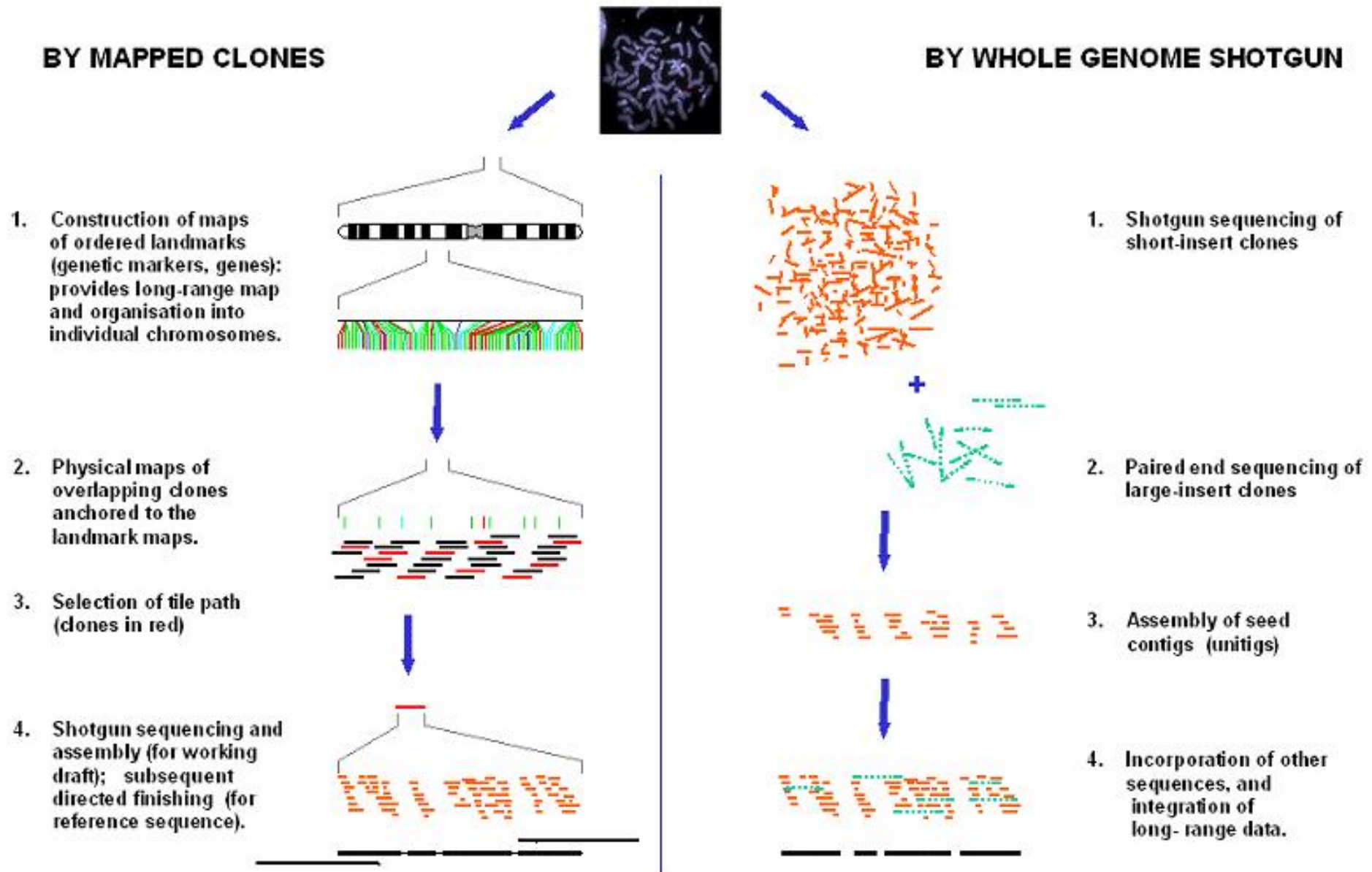
In « La bataille de l'ADN », Laurent Alexandre, Le Monde, Sciences & Médecine, 2016/06/08 page SCH7

**PREMIER PROBLÈME :
LA FIABILITÉ DU SÉQUENÇAGE...**

« Les faire évoluer pour les améliorer constitue notre cœur de métier, poursuit Jeffrey Sander (Pioneer). Chaque fois, il faut recommencer le séquençage. »

In « Dans la fabrique des plantes du futur », Nathaniel Herzberg, *Le Monde Sciences & Médecine*
2017/06/07 page sch4

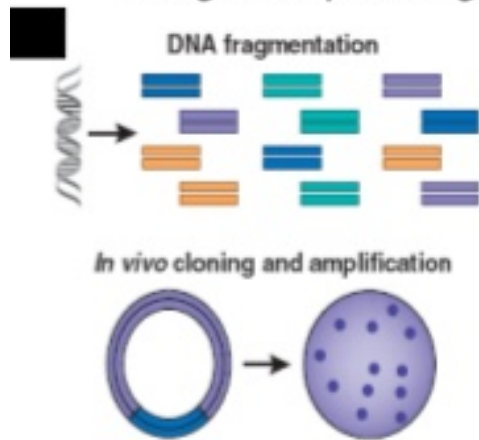
STRATEGIES FOR SEQUENCING THE HUMAN GENOME



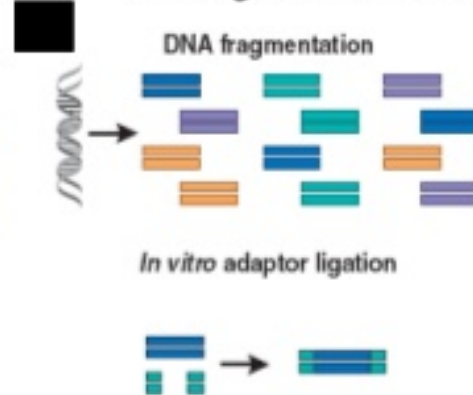
Séquençage toujours coûteux: avec des techniques, plateformes, références et logiciels aux

Next-generation DNA sequencing

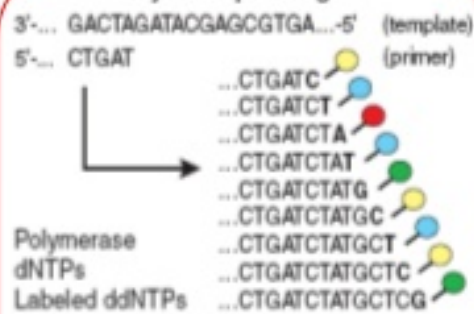
Sanger sequencing



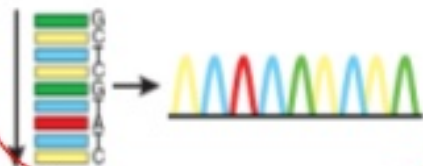
Next-generation sequencing



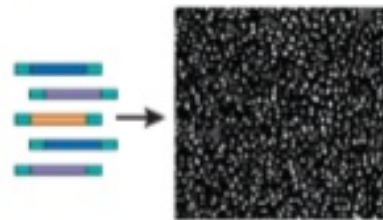
Cycle sequencing



Electrophoresis (1 read/capillary)



Generation of polony array



Cyclic array sequencing ($>10^6$ reads/array)



Advantages:

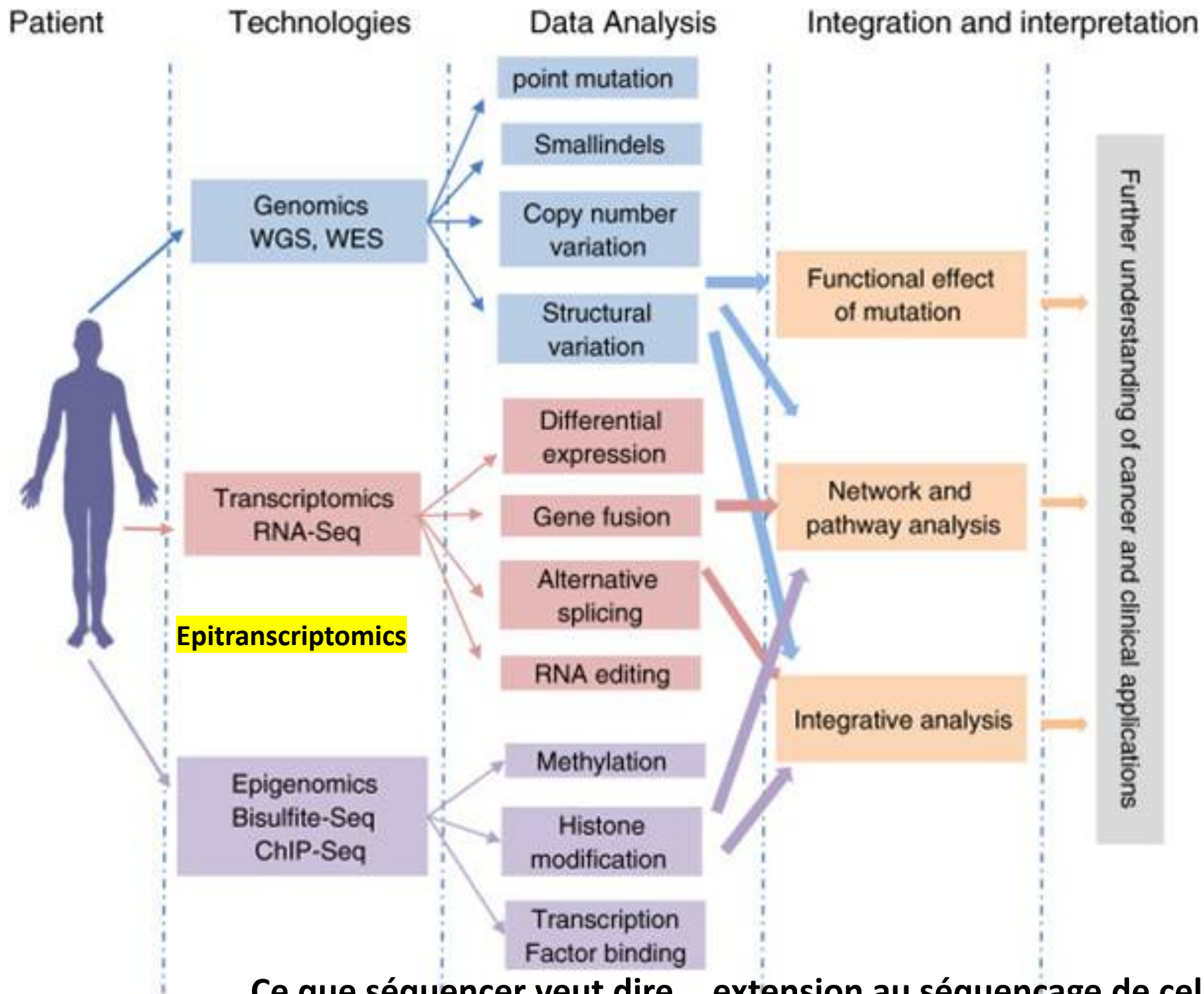
- Construction of a sequencing library \rightarrow clonal amplification to generate sequencing features

- ✓ No *in vivo* cloning, transformation, colony picking...

- Array-based sequencing

- ✓ Higher degree of parallelism than capillary-based sequencing

Drawback: less accurate



Ce que séquencer veut dire... extension au séquençage de cellules...

Séquençage: des étapes cruciales pour un résultat onéreux si on le veut « fiable »...

- La qualité de l'ADN extrait,
- La préparation des bibliothèques
- Réduire les erreurs dues aux réactions enzymatiques, ex: amplifications PCR, RT-PCR...,
- Techniques / plateformes NGS à combiner avec différents logiciels pour réduire les erreurs propres à chacun(e),
- Le séquençage de zones ADN difficiles (séquences répétées, duplications de gènes, inversions/translocations, régions à fort taux de polymorphisme, confusion G/I pour ARN, méthylations...) à fortement améliorer, en particulier pour génomes non modèles,
- Les « séquençages » d'épigénomes: ADN modifié, protéines modifiées, ARN modifiés
- Logiciels de séquençage, d'assemblage, d'annotation, de comparaison: privilégier la fiabilité à la vitesse,
- Le besoin de génomes de référence,
- Des bases de données à « curer » de leurs nombreuses erreurs de séquençages et d'annotation,

Des besoins importants en formation, en assurance qualité, de normalisation des méthodes de correction d'erreurs, des recommandations de tests d'aptitude et de systèmes d'accréditation...

Les techniques connexes et de modifications des génomes et épigénomes laissent de nombreuses « cicatrices » dans les génomes et épigénomes (ADN, protéines et ARN)

**DEUXIEME PROBLÈME :
LA PRÉDICTION FIABLE DES OFF-TARGETS...**

Off-targets

- Séquençage complet fiable encore coûteux d'où recherche préférentielle des possibles off-targets
- Logiciels de prédiction encore peu fiables (dépend données par exemple de types cellulaires utilisés, des algorithmes...)
- Le problème s'accroît avec le multiplexage et les diverses combinaisons d'enzymes modifiées ou non, ciblant l'ADN ou l'ARN

**TROISIÈME PROBLÈME :
DÉTECTER LES SAUTS D'EXON...**

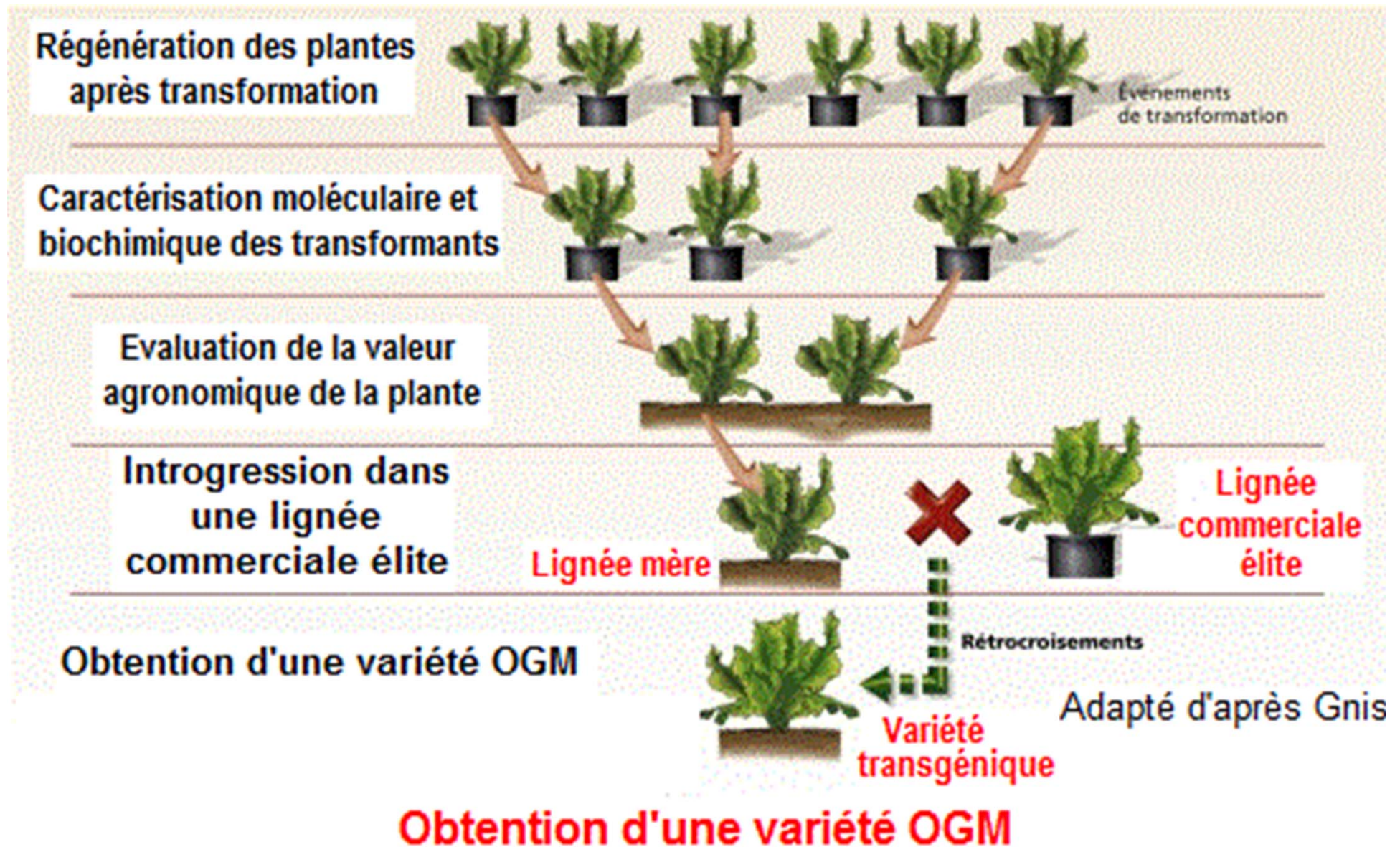
Sauts d'exon

- Un facteur de maladies chez l'homme...
- Avec Crispr-endonucléase, saut d'exon inattendu pouvant aboutir à des protéines pathogènes,
- Peut masquer des résultats négatifs d'utilisation de systèmes Crispr
- Il faut donc vérifier les ARN ou protéines produits après des modifications par des systèmes Crispr...

QUATRIEME PROBLÈME :

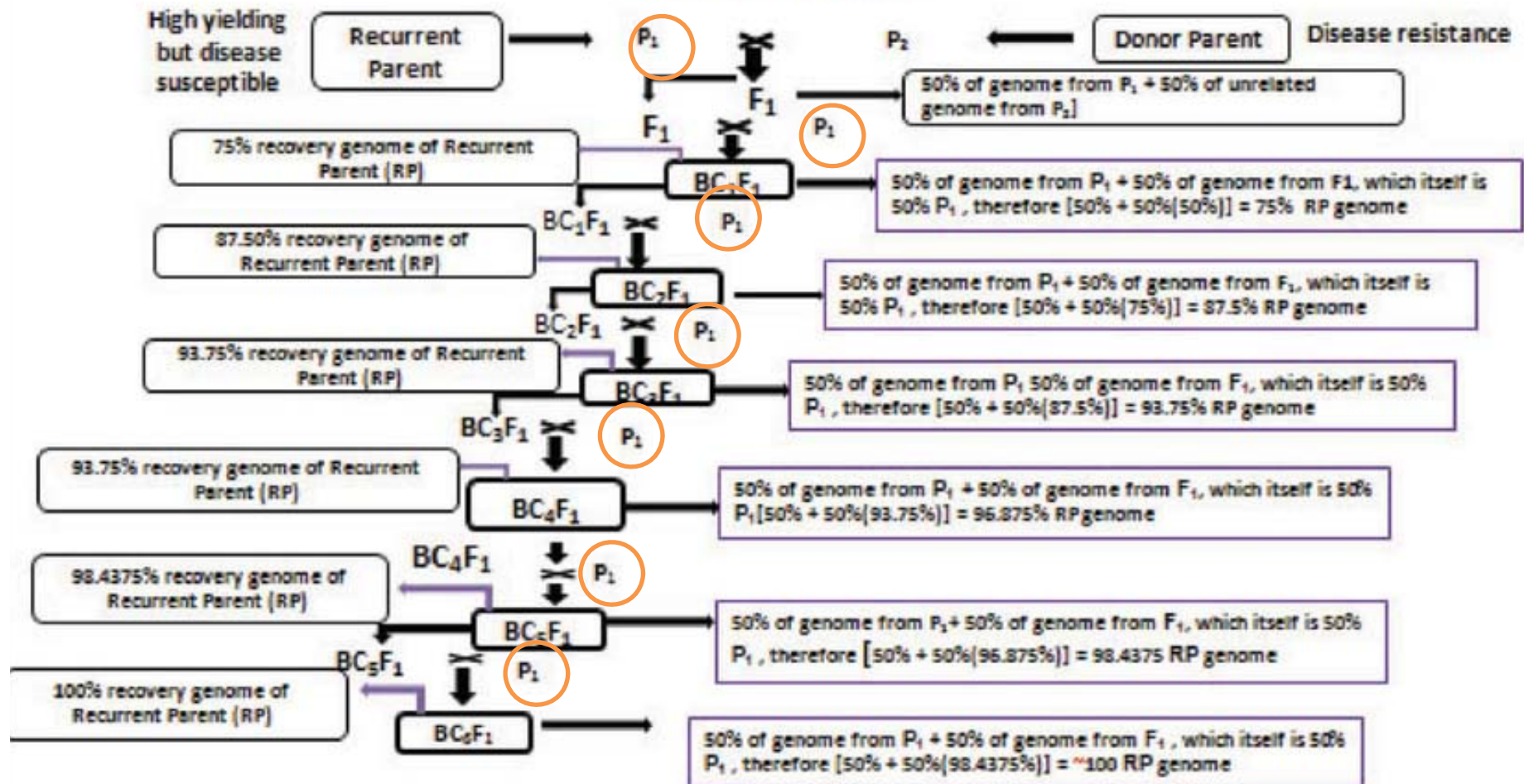
**PURGER LES GÉNOME, ÉPIGÉNOME ET ÉPITRANSCRIPTOME DES
EFFETS INATTENDUS ET INDÉSIRABLES...**

Après les modifications...



**EN L'ABSENCE DE CONNAISSANCES SUFFISANTES SUR LES
ÉPIGÉNOMES, ET ÉPITRANSCRIPTOMES ET DE LIGNES
DIRECTRICES, SEULES LES MODIFICATIONS GÉNÉTIQUES SONT
« CONSIDÉRÉES »**

Backcross Method



General equation for average recovery of the recurrent parent:

$$1 - \left(\frac{1}{2}\right)^n$$

where, n is the number of backcrosses to the recurrent parent.

for the F₁, n=0;

for BC₁, n=1;

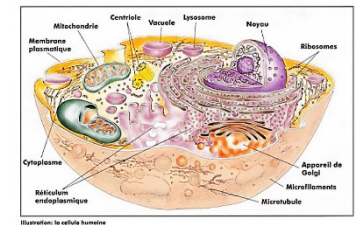
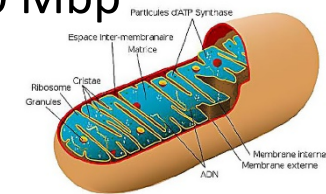
for the BC₂, n=2;

for the BC₃, n=3, etc.

Exemple (valeurs théoriques inexactes de pureté) de rétrocroisements pour l'introgession d'un trait / caractère

Elimination par rétrocroisements

- Un nombre de rétrocroisements trop faible en pratique (généralement 6 au lieu de 14),
- Même avec le nombre requis de rétrocroisements, statistiquement (~95%) des quantités importantes d'ADN non « purgé » (ex. blé : 500 Mbp sur 17Bbp)
- Des problèmes de co-ségrégation entre caractères désirés et à éliminer,
- Des régions – souvent grandes - à comportement non mendélien,
- Des difficultés particulières avec les polyploïdes, les pérennes et les espèces à multiplication végétative,
- Rien n'est dit quant aux plastes, qui réagissent aussi aux stress,
- Des outils de séquençage insuffisants pour vérifier la qualité de la purge du génome et encore plus des épigénomes (ADN, ARN et protéines), sans compter les effets des sauts d'exon sur les ARN et protéines.



POUR « RÉSUMER »

Problèmes avec les NTMGE

- Un recours majoritaire à des systèmes de réparation haute fréquence mais très sujets aux erreurs (NHEJ, MMEJ),
- Un champ d'application limité par ex:
 - nécessité de proximité de séquences PAM pour étendre le champ d'action dans un génome ou à d'autres espèces (ex: Cas à PAM AT vs. GC riche)...
 - tailles des éléments insérables limitées ce qui est un problème par ex chez les mammifères
- La capacité de modifications mono- et oligo-géniques, peu de /quelques QTL, des multiplexes sources de très nombreuses coupures inductrices chez l'homme de cancers...
- Une faible efficacité de modifications car forte dépendance des concentrations en réactifs, des systèmes de vectorisation plus ou moins efficaces (*Agrobacterium*, PEG, électroporation, injections ou virus chez animaux), dépendance également des types cellulaires, variétés, espèces, âge... : au total de nombreux ratés d'où la mise en place de « banques » comme *Addgene* pour partager « ce qui marche »,
- De très nombreux effets hors-cibles (avec des annonces de réduction d'un facteur 1500) génétiques et épigénétiques, difficiles à prévoir (dépend des séquences disponibles du génome considéré) et détecter (capacités des logiciels, manque de génomes de référence fiables...) sauf à se focaliser sur certains points (d'où des revendications d'effets hors-cibles non détectables car seule une partie du génome a été étudiée) car le séquençage « en profondeur » (on est passé de quelques dizaines à plusieurs milliers de re-séquençages de préférence avec plusieurs plateformes et différents logiciels pour améliorer la robustesse des résultats) coûte encore cher (même si annoncé comme devant rejoindre bientôt le prix d'une analyse PCR pour des résultats bruts),
- Insertions ou modifications d'ADN semblent s'accompagner systématiquement de modifications épigénomiques (ADN, protéines et ARN) proches et distales, très mal appréhendées en séquençage, alors qu'un colloque de l'EFSA concluait en juin 2016 que les scientifiques commencent seulement à savoir où travailler.
- Même chose pour les modifications de l'épitranscriptome encore moins bien connues, et les effets des sauts d'exon jamais étudiés...
- De nombreux risques d'insertion d'ADN ou d'ADNc, d'où le développement de complexes ribonucléoprotéiques (sans ADN), même avec les enzymes purifiées (RNP),
- Des besoins constants de plusieurs répétitions indépendantes (si possibles avec des techniques différentes) pour tenter de vérifier que la modification phénotypique observée résulte réellement de la modification NTMGE visée
- Des logiciels de prédictions (et détection) des off-targets (distaux) encore peu fiables, quelquefois spécifiques de lignées cellulaires,
- Des capacités de « purge » des noyaux et génomes plastidiaux largement surestimées...
- Au total une cuisine importante tous azimuts avec de nombreuses revendications non vérifiées (hormis NgAgo...) et des comparaisons quasi impossibles (ex: quantités relatives d'off-targets de TALEN vs. Crispr) qui expliquent que les firmes signent des accords de licence pour plusieurs techniques.
- Des techniques, dont les Crispr, très loin de l'image idyllique véhiculée par certains médias, même si les techniques SDN facilitent des mutations plus ciblées...
- Plus globalement des techniques non stabilisées, en plein développement, aux effets difficilement prédictibles par leur nouveauté, le manque de recul et le nombre de variantes et combinaisons entre techniques (Cas9 modifiée: nickase), Cpf1 vs. Cas9, modification ARN vs. ADN (C2C2/ Cas13a, RCas9)...

QUELLE ÉVALUATION DES RISQUES?

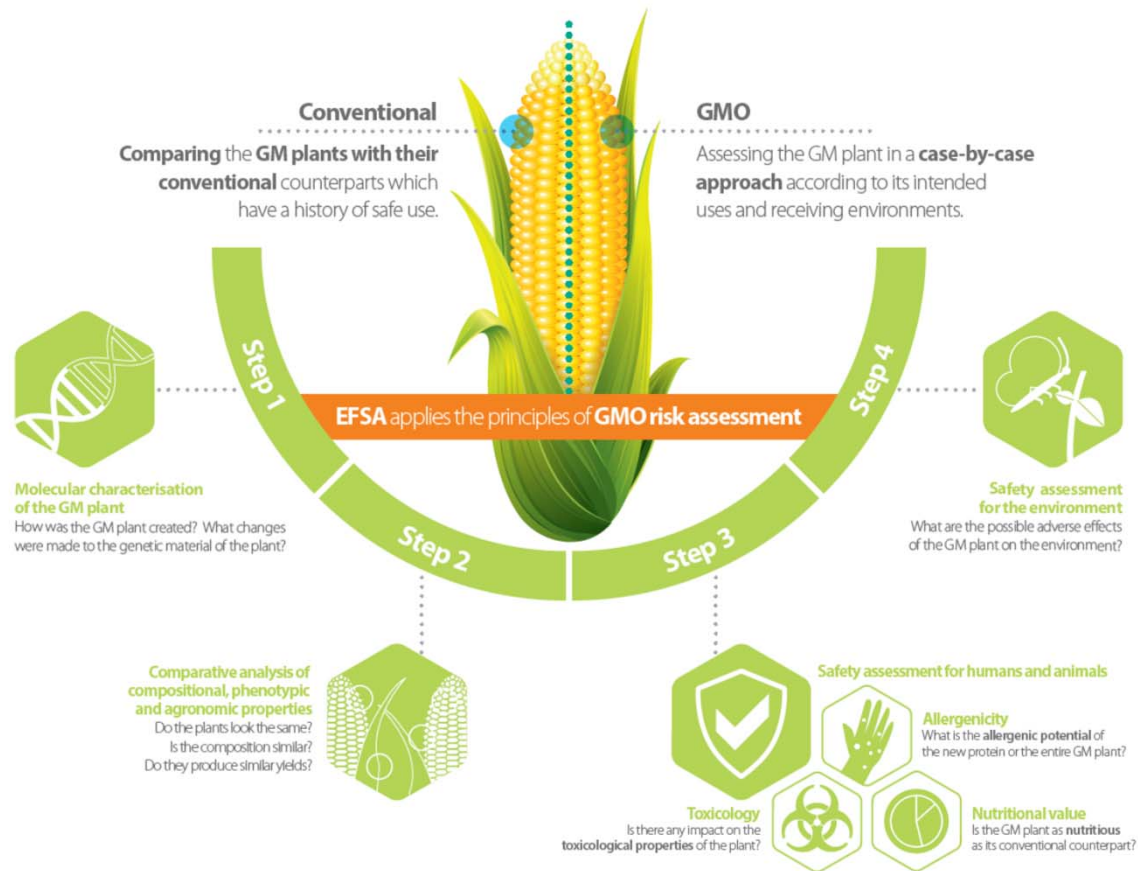
Risk assessment of genetically modified plants



EFSA evaluates the safety of **genetically modified (GM) plants** – such as maize, soybeans, cotton and oilseed rape – before these plants are authorised for import into the EU for use as food or feed or for cultivation.



The **genetic modification** provides the plants with additional properties such as a better **resistance to plant-eating insects**, a stronger **tolerance of herbicides** or both.



Evaluation des risques

- Comme observé pour la transgénèse actuelle: de nombreux effets inattendus pour les NTMGE, de même nature et des nouveaux : toutes les procédures pour les OGM devraient donc s'appliquer aux produits NTMGE (= un minimum), plus de nouveaux concernant l'épigénétique et l'épitranscriptomique
- Se rappeler qu'un certain nombre d'acides nucléiques passent des barrières, comme la barrière intestinale, et peuvent réguler l'expression de gènes de l'hôte,
- Une modification génétique entraîne quasi systématiquement une ou plusieurs épimutations,
- Un seul nt modifié peut avoir des répercussions à plusieurs mégabases de distance,
- On ne peut comparer une modification locale artificielle (nombreuses quand mutagénèse induite) à une mutation naturelle que si on étudie tout le génome pour toutes les modifications induites, refuser l'effet « *arbre qui cache la forêt* »...
- Absence de lignes directrices d'évaluation pour les épigénétiques. Colloque EFSA juin 2016 : .../...
The main take-home message from the colloquium was to ask and seek answers to those questions that will increase our understanding of epigenetics. What do epigenetic modifications mean? How do we study them? What is the size of such modifications that we need worry about? Dr Robert Feil of the National Centre for Scientific Research (CNRS), France, said: "We have had some very good discussions and I think this will certainly help us to formulate more precisely what these questions are and to formulate how we want to go ahead."

Que ce soit pour la santé ou l'environnement, un dossier complet de type OGM apparaît donc comme le minimum requis pour approcher les risques éventuels de ces techniques en développement depuis plus de 10 ans et pour préparer les suivis post-commercialisations (surveillances spécifique et générale)

**DÉTECTION ET IDENTIFICATION DES
PRODUITS NTMGE ET DES TECHNIQUES
À LEUR ORIGINE**

Traçabilité des produits NTMGE: une confusion savamment entretenue

- Traçabilité (norme ISO) : facile et bon marché, ne dépend que du bon vouloir des distributeurs : *Traceability* is the ability to identify and trace the history, distribution, location, and application of products, parts, materials, and services. A traceability system records and follows the trail as products, parts, materials, and services come from suppliers and are processed and ultimately distributed as final products and services.
- Détection : facile et relativement bon marché selon les techniques utilisées, dépend de la firme
 - Action ou procédé de découverte, mise en évidence ou de noter quelque chose.
 - Très facile à réaliser quand la cible est connue (veille, brevet, bases de données...), OGM inconnus : différentes méthodes aux résultats quelquefois de faible poids convergents et à l'utilisation facilitée par des DSS
 - Méthodes : phénotype (ex: plantule tolérante à un herbicides, méthodes immunologiques, PCR, LCR, Q β replicase, SNPLex, LAMP, spectroscopie (méthodes pour omics)... au champ et au laboratoires selon ese méthodes (ex: PCR et LAMP au champ)
- Quantification:
 - Méthodes quantitative s
 - Pour les méthodes qualitatives : position envers un seuil avec des méthodes de sous-échantillonnage comme par exemple celles utilisées en certification de semences.
- Capacité à différencier dans plusieurs cas produits issus de mutagénèse *in vitro* et *in vivo* (cicatrices, fréquences de délétions, transversions...)
- Identification de la NTMGE utilisée / du propriétaire du produit : des signatures sont utilisables en approche matricielle avec ou sans DSS et NGS
 - Approche matricielle initiale: profils de mutations et épimutations (toutes techniques)
 - Signatures génétiques et épigénétiques de l'effet Crispr-endonucléases
 - Systèmes de structuration moléculaire...
 - Pour définir à la fin les signatures univoques utilisables en routine...



Identification des produits et techniques NTMGE

- En 2013: proposition du réseau européen ENGL de travailler sur la détection des produits NBT, refus de la CE...
- Ne pas rester que dans les techniques classiques type PCR, LCR, SNPLex... On peut utiliser les fréquences de transversion, la détection d'épimutations... Surtout dans la phase recherche initiale...
- Fondamentalement, il s'agit du même type de détection / identification que celui des variétés: polymorphisme de divers marqueurs moléculaires, logiciels et tests statistiques... Mais avec des marqueurs nettement plus faciles à détecter et combiner...
- La stratégie rejoint à son début celle de la détection des OGM inconnus: établissement d'un faisceau convergent de preuves...
- Il suffit ensuite de n'utiliser qu'une des signatures du produit, des cicatrices permettant d'assurer qu'il s'agit de mutations *in vitro*...

L'identification de la technique NTGME initialement utilisée est tout à fait possible

ECONOMIE DE LA PROMESSE

**EX: VERS UNE ACCÉLÉRATION DE LA
SÉLECTION?**

NTMGE et sélection variétale

- Les NTMGE: une révolution ? Vraiment ? Des méganucléases d'il y a 20 ans aux systèmes d'immunité acquise comme Crispr-endonucléase...
- Un accélérateur de la sélection variétale?
 - Variétés Elite pas plus modifiables maintenant... Cantonnement aux variétés et espèces transformables jusqu'à présent (cf. colloque 2016)...
 - Réduction du temps de criblage, sélection et d'intégration de nouveaux traits ? Alors qu'une très grande variabilité naturelle existe encore, ex: maïs criollo, différences entre Elite...
 - Nouveaux caractères ? Synténie, homologies et variations entre espèces et cultivars ? Traits mono / oligo / multigénique ? QTL ? Une variation dans une variété ne s'exprime pas forcément de la même manière dans une autre (effet du fond génétique, de l'environnement...), l'épigénétique des conditions de culture des parents influence l'expression de caractères dans les descendances (cf. tolérance à la sécheresse: maïs des firmes vs. CIMMYT...),
 - Une capacité à améliorer la résilience des cultures face au changement climatique alors que la sélection des maïs US a abouti à une plus grande sensibilité à la sécheresse ? Aux maladies et parasites émergents alors que les NTMGE se focalisent sur les résistances verticales, risquant ainsi?
 - Des produits orientés consommateurs plutôt qu'agriculteurs ?
 - La majorité des brevets concernent des résistances aux insectes et des tolérances aux herbicides...

Une biologie moléculaire mécaniste des années 1970
Une économie de promesses comme les OGM des années 90
et le clonage il y a 20 ans
Un verrou technologique supplémentaire
Une longue bataille de brevets avant les accords croisés
L'évolution de l'exemption de la recherche, et de l'agriculteur...

Jeffrey Sander (Pioneer, Johnston, Iowa) :
« En plus, le génome des plantes présente une extrême diversité, souligne Jeffrey Sander, chercheur au département d'ingénierie moléculaire. Entre deux variétés de maïs, il y a la même distance génétique qu'entre un homme et un singe. »

In « Dans la fabrique des plantes du futur », Nathaniel Herzberg, *Le Monde Sciences & Médecine* 2017/06/07 page sch4

MÉTAPHORES, COMMUNICATION ET RHÉTORIQUE

Quelques métaphores trompeuses

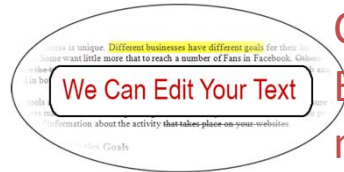
SDN (ciseaux moléculaires):
ne prévoyez pas une coupe
unique et précise



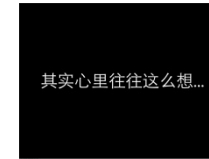
Mais plutôt une série de
découpes (avec de petits
morceaux à rabouter
par un mécanisme de
réparation incontrôlé)



Edition du génome... Vous attendez
vous à une écriture
Électronique de langues
Connues ?



Ce que vous avez
Effectivement à éditer: un
manuscrit entre langues
inconnues



plus



La modification précise promise



Les 'hors cibles' obtenus
en raison
d'effets 'ricochets' dus aux
homologies de séquence

Mais plutôt
les « orgues
de Staline »



Donnant
des
cellules



Mutagenèse ciblée : n'oubliez pas
un 'one shot'



En raison de la
"vectorisation", des ciseaux
moléculaires et d'autres
réactifs
nécessaires aux
modifications du génome



Pour un questionnement éthique du débat autour des nouvelles techniques de modification du génome

- Une confusion entretenue entre science et innovation, scientifique et expert,
- Une bataille sémantique et rhétorique quant à la nature et une tentative d'accaparement, une privatisation de la notion d'intérêt général...
- Une notion quasiment inconnue parmi les experts : le lien d'intérêt (dont l'institutionnel), et la nécessité de neutralité et de transparence,
- Une condescendance de certains experts vis-à-vis des profanes et politiques qui ne suivent pas leur avis,
- Une approche par le comment technologique, pas du pourquoi
- Des limitations techniques ne favorisant pas la diversité agricole ni la biodiversité ordinaire,
- Des chartes d'éthique inconnues et inappliquées...

Ces NTMGE : une nouvelle étape pour une agriculture intensive, affectant la biodiversité locale et distante, subventionnée et écrasant les agricultures locales et diversifiées? Un nouvel exemple de collusion d'administrations, de politiques sur des choix que doivent valider quelques scientifiques et de politisation de la science autant que de scientisation de la politique...

CONCLUSION

Conclusion

- Les produits NTGME sont-ils des OGM?
- Pourquoi il est préférable de continuer avec le système existant par ailleurs incomplet (aucune évaluation des modifications épigénomiques, surveillance générale post-commercialisation, disponibilité d'experts, coûts)
- Les produits NTMGE sont-ils détectables et la technique d'origine identifiable?



Le principe de précaution Expérience du Comité de la Prévention et de la Précaution (CPP)

Construction d'une approche



Philippe HUBERT



*maîtriser le risque
pour un développement durable*

Après des années dans des instances d'expertise, en particulier au HCB, j'aime rappeler cette phrase de Pierre Gilles de Gennes (prix Nobel) :

« Vous savez, les experts sont souvent comme les militaires. Ils sont experts de la dernière guerre mais pas de la prochaine... »

MERCI POUR VOTRE ATTENTION



Une économie de promesses

Genta: 1998-2012

The strange but true tale of a beleaguered with 100 quadrillion shares outstanding.

Fraud and misconduct in science: the stem cell seduction

Implications for the peer-review process

ETATS-UNIS

Une start-up d'analyses sanguines soupçonnée d'avoir menti sur sa technologie

Par Anais Cherif <http://www.liberation.fr/auteur/16518-anais-cherif> — 19 avril 2016 à 17:18



the guardian
What pushes scientists to lie? The disturbing but familiar story of Haruko Obokata
The spectacular fall of the Japanese scientist who claimed to have triggered stem cell abilities in regular body cells is not uncommon in the scientific community. The culprit: carelessness and hubris in the drive to make a historic discovery



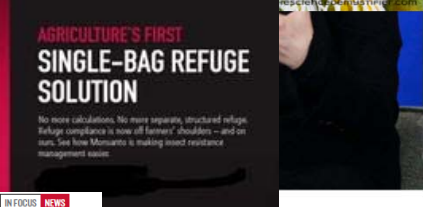
Breakthroughs IN BIOSCIENCE

Cloning: Past, Present, and the Exciting Future

by Marie A. Di Berardino, Ph.D.



too-distant
...to the neighborhood...
...scentific cloned from an adult cell, one taken from a ewe's mammary gland.
Nuclear transfer
Dolly was not created in the ordinary way. Typically, a lamb is the product of natural reproduction—two germ cells, a sperm from an adult male and an egg (oocyte) from an adult female, fuse at fertilization. Each of these germ cells (the sperm and the oocyte) combines half the chromosomes needed to create a new individual. Chromosomes are found in the cell's nucleus and they carry DNA, which is the genetic blueprint for an individual.
The process that produced Dolly differs from ordinary reproduction in two major ways. First, body (somatic) cells from an adult udder (this is the di in a culture dish as...
The somers were from the culture, w cells growth. One growing cells was 1 electric jobs) with oocyte from which been previously re-



Drug giants turn their backs on RNA interference
A once much-touted technique faces a difficult transition to the clinic.

BY REBEKKA LEBSON

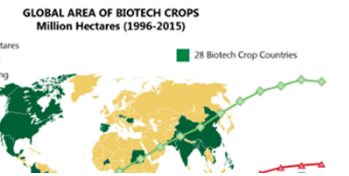
Not long ago, a technique called RNA interference (RNAi) seemed to be the fast track to commercial success. Its discovery in 1998 revealed a new way to halt the production of specific proteins using specially designed RNA molecules, and it quickly became a favorite tool of basic research. In 2006, the scientists who made the discovery were awarded the Nobel prize for medicine, and the New Jersey-based pharmaceutical giant Merck paid over \$1 billion to launch a small Therapeutics in San Francisco, California—one of the first biotechnology companies aiming to

than originally thought," says Michael French, view of the RNAi platform, says both Scrim-

Indication	Company	Clinical phase	Delivery method
Age-related macular degeneration	Quark Pharmaceuticals/ Pfizer/Sentis Therapeutics	Phase I	Naked RNA
Duchenne muscular dystrophy	Quark Pharmaceuticals/Pfizer	Phase I	Naked RNA
SRV	Sumitomo	Phase I	Lipid nanoparticle
Liver cancer	Alnylam/Seisun	Phase I	Lipid nanoparticle
TTR amyloidosis	Alnylam/Seisun	Phase I	Lipid nanoparticle
Respiratory syncytial virus	Alnylam/Calad Pharmaceuticals/ PyroScience	Phase I	Inhaled naked RNA



N° 2198
ASSEMBLÉE NATIONALE
CONSTITUTION DU 4 OCTOBRE 1958
ONZIÈME LEGISLATURE
Enregistré à la présidence de l'Assemblée nationale le 24 février 2000
OFFICE PARLEMENTAIRE D'ÉVALUATION DES CHOIX SCIENTIFIQUES ET TECHNOLOGIQUES
RAPPORT SUR LE CLONAGE, LA THÉRAPIE CELLULAIRE ET L'UTILISATION THÉRAPEUTIQUE DES CELLULES EMBRYONNAIRES
PAR M. Alain CLAEYS, Député.
PAR M. Gilles RICHARD, Sénateur.



Debut Issue 2018
The Cutting Edge of CRISPR Research

Molecular Therapy
Is RNAi Dead?
A recurring theme in the way that many pharmaceutical companies approach new technologies is that they are initially extremely enthusiastic, perhaps excessively so, but then subsequently overreact in the opposite direction, abandoning them when the first bumps in the road come along. Only a few years ago, the affection of big pharma for RNA interference (RNAi) seemed unlimited. Merck had acquired...
strategies to improve internal R&D productivity none of these has shown the hoped-for benefit. Enter RNAi. RNAi promised rational design with unparalleled specificity and fast development, and it obviated the issue of druggable targets. In theory, a research team pick a new drug target and have a lead RNAi specific for its gene ready for human clinical within 15 months. A good deal of early pharma...
The RNAi platform, says both Scrim-

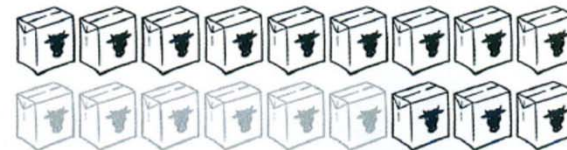
ECONOMIE DE LA PROMESSE

NOURRIR LE MONDE ?

L'EFFONDREMENT DE LA BIODIVERSITÉ AGRICOLE!

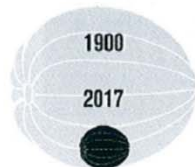
75% des variétés comestibles ont disparu en un peu plus d'un siècle.

3/4 DE NOTRE ALIMENTATION MONDIALE ASSURÉS PAR SEULEMENT 12 ESPÈCES VÉGÉTALES ET 14 ESPÈCES ANIMALES.

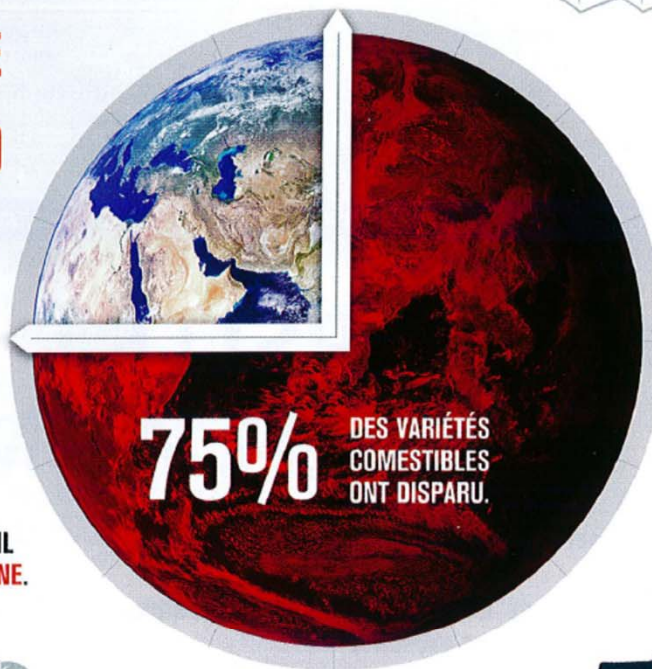


PLUS DE 70%

DES LÉGUMES PRODUITS DANS L'UNION EUROPÉENNE SERAIENT ISSUS DE SEMENCES HYBRIDES, RENDANT LES PRODUCTEURS TRÈS DÉPENDANTS DES **MULTINATIONALES AGROALIMENTAIRES**.



DES **73 VARIÉTÉS** TRADITIONNELLES DE MELON CULTIVÉES AU DÉBUT DU XXE SIÈCLE, IL N'EN EXISTE PLUS **QU'UNE**.



75% DES VARIÉTÉS COMESTIBLES ONT DISPARU.

2/3

DE LA PRODUCTION DE LAIT DANS LE MONDE EST DOMINÉ PAR **5 RACES BOVINES**.



60%

DES CALORIES ET PROTÉINES VÉGÉTALES CONSOMMÉES PAR L'HUMANITÉ NE PROVIENNENT QUE DE **3 CÉRÉALES** : LE RIZ, LE MAÏS ET LE BLÉ.



7 VARIÉTÉS TRADITIONNELLES DE TOMATES CONTRE **30** EN 1900.



AUJOURD'HUI, LA RACE BOVINE LA PLUS RÉPANDUE, LA **HOLSTEIN FRISONNE**, EST PRÉSENTE DANS **128 PAYS**

Source : International Livestock Research Institute, 2014 / FAO

Nourrir le monde...

Le gaspillage alimentaire en chiffres

En France, ce gâchis représente chaque année plusieurs milliards d'euros. Il concerne tous les acteurs, du producteur au consommateur.

PRÈS DE
50 MILLIONS
DE REPAS JETÉS
À LA POUBELLE
CHAQUE JOUR
DANS NOTRE PAYS



Dans le monde, **1/3 DES ALIMENTS** destinés à la consommation humaine est gaspillé.



Chaque Français jette chez lui plus de **20 kg de nourriture par an**, dont 7 kg d'aliments encore emballés.

UN GÂCHIS SUR L'ENSEMBLE DE LA CHAÎNE



Fruits et légumes abîmés, poissons trop petits rejetés morts en mer...



Processus ou conditionnement défectueux en usine...



Casse, rupture de la chaîne du froid, produits abîmés ou invendus...



dont **14%** pour la restauration collective et commerciale. Déchets de préparation, restes de repas, mauvaise gestion des stocks...

19% pour la consommation à domicile. Restes de repas jetés, produits périmés...



DES ENJEUX ÉCONOMIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX

Le coût annuel du gaspillage alimentaire en France est estimé à **16 MILLIARDS D'EUROS**.

L'impact carbone des pertes et gaspillages est évalué à **15,3 millions de tonnes équivalent CO₂**, soit 3% de l'ensemble des émissions de l'activité nationale.

Toujours la course de la Reine rouge...

- Stratégies de résistance à un pathogène:
 - Horizontale: polygénique, résiste longtemps, des pertes, fonds génétique, concentration des firmes...
 - Verticale: mono- ou oligo-génique, rapidement surmontée selon la pression de sélection, recherche incessante de variants de gènes de résistance,
- Tolérance à la sécheresse, salinité... Des causes multifactorielles et des sélections variétales ayant accru la sensibilité à la sécheresse, cf variétés CIMMYT vs. Syngenta
- Lutte contre les adventices (biodiversité, résistances, toxicité des anciennes molécules réintroduites avec...), plus de 500 brevets pour les NTMGE quant aux tolérances aux herbicides...

Compétitivité internationale, exportations, balance commerciale...

Donc produire plus pour jeter plus et produire du biofuel pour diversifier les sources de revenus des agriculteurs ?

Mauvaises herbes résistantes au glyphosate

Évolution du nombre d'espèces

Données : The International Survey of Herbicide Resistant Weeds

Nécessité d'introduire des empilages de gènes avec des tolérances à des produits plus toxiques comme le 2-4D, le Dicamba (nombreux procès en cours) ...



ECONOMIE DE PROMESSES



MALADIES...

Maladies et vecteurs

- Moustiques vecteurs de Zika, Dengue et Chikungunya,
- Lucille bouchère...
- Dystrophie musculaire de Duchenne
- Tiques vectrices de borréliose et autres maladies émergentes...

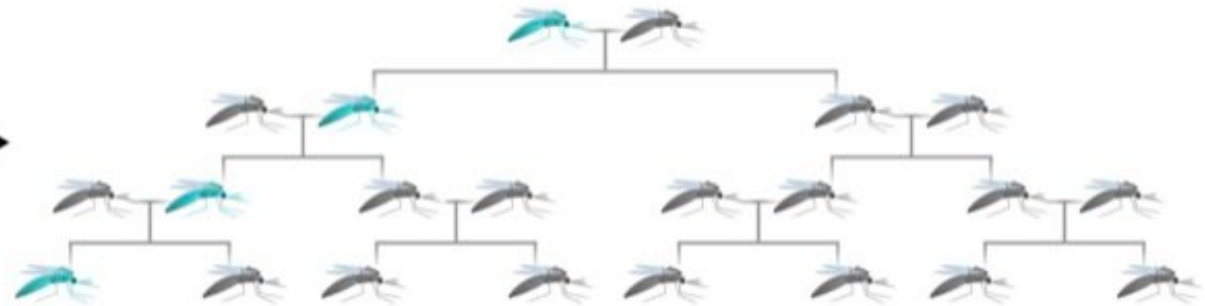
Une nouvelle technique de contrôle des populations

Altered Gene Wild-Type



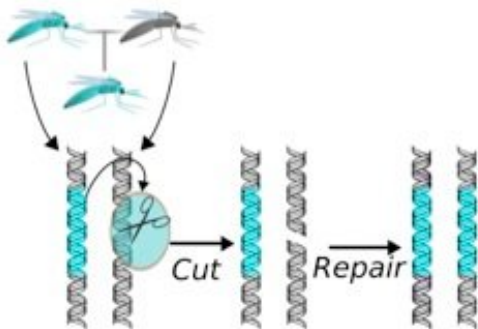
Altered Gene Only
1 copy inherited from 1 parent
50% chance of passing it on

Normal Inheritance



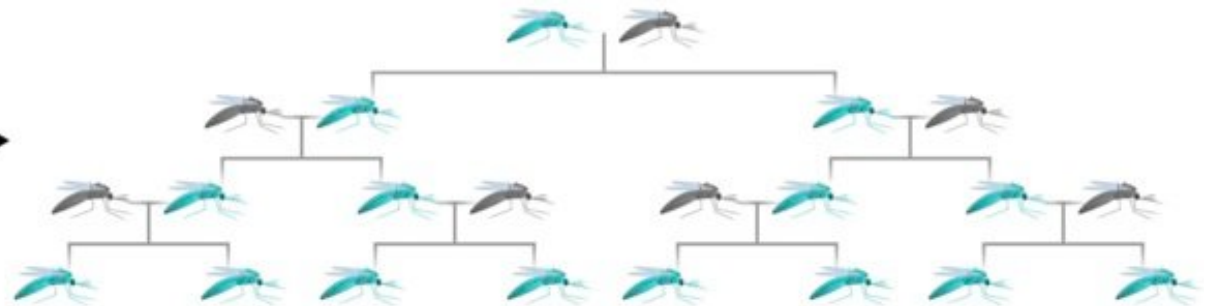
Altered gene does not increase

Gene Drive Wild-Type



Altered Gene + Gene Drive
1 copy → 2 copies
100% chance of passing it on

Gene Drive Inheritance



Altered gene is always inherited due to gene drive

Dans son allocution d'ouverture de la 69^e Assemblée mondiale de la santé, lundi 23 mai, la directrice générale de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a évoqué les épidémies de Zika et de dengue, et la menace du Chikungunya, auxquelles on pourrait ajouter celle de la fièvre jaune qui s'étend en Afrique. Le Dr Margaret Chan a parlé du « *prix payé pour un échec massif de la politique qui a laissé tomber le contrôle des moustiques au cours des années 1970* ».

.../...

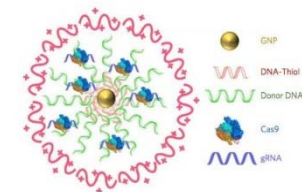
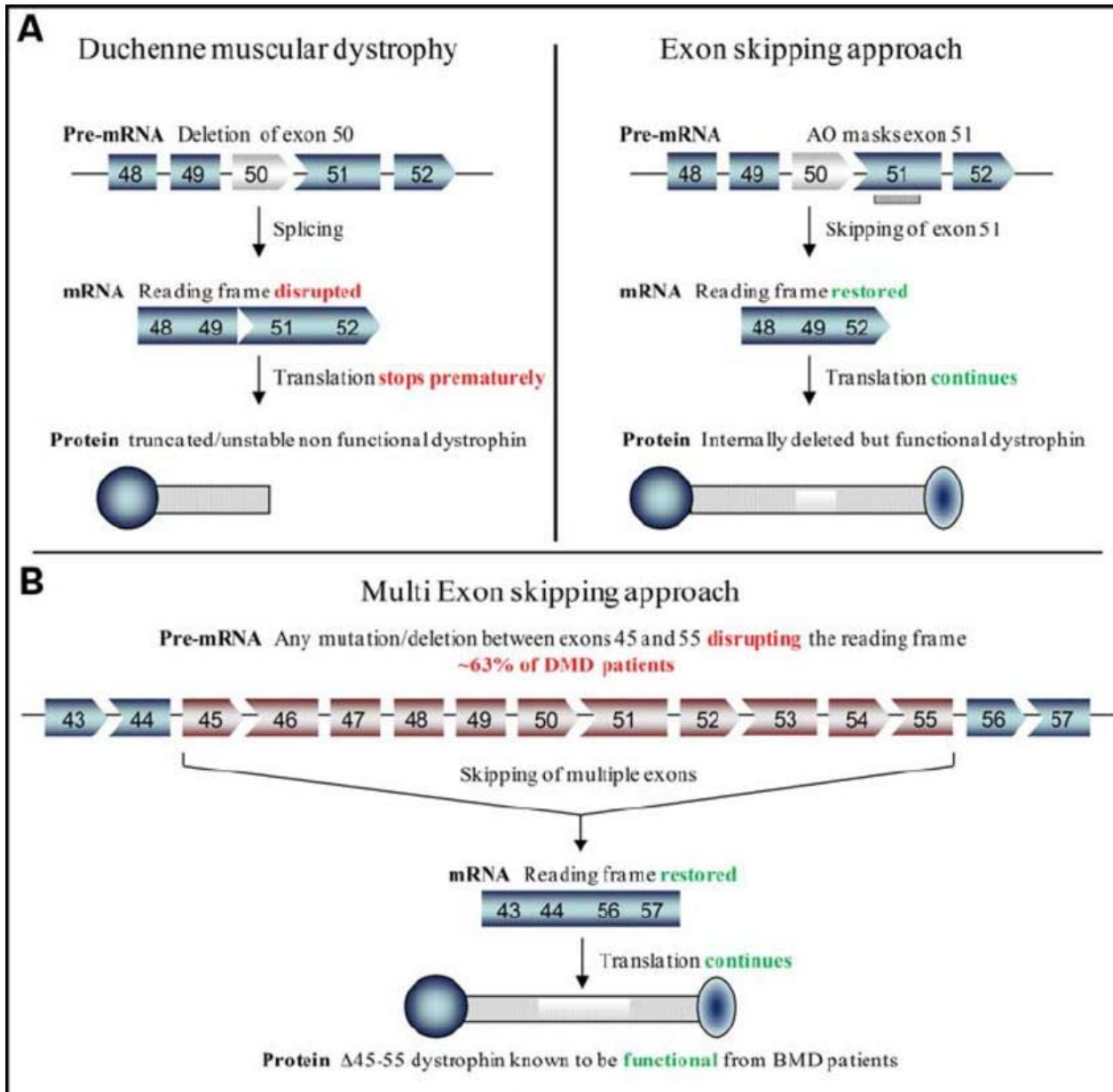
La directrice générale a également mis en garde contre les « *trois désastres au ralenti* » dus à « *la main de l'homme, créés par des politiques qui placent les intérêts économiques au-dessus des préoccupations du bien-être des vies humaines et de la planète sur laquelle ils vivent* » : le changement climatique ; l'échec croissant de plus en plus des principaux antibiotiques ; et la montée des maladies non transmissibles chroniques.

In « Zika, dengue : le prix payé pour l'abandon de la lutte contre les moustiques. » et « A l'Assemblée de l'OMS : « La propagation de Zika est le résultat de l'abandon du contrôle des moustiques » Paul Benkimoun, Le Monde 2016/05/26 et 2017/05/23

Une capture de rente...

Economie de la promesse: dystrophie musculaire de Duchenne

2 articles en 2016 dans Science sur des réparations partielles de la dystrophine (modèle souris):
2 entreprises sur les rangs avec des systèmes différents...



Economie de la promesse: dystrophie musculaire de Duchenne

- Réactions inflammatoires, réponses immunitaires... A la différence d'autres thérapies les effets secondaires, inconnus, persisteront bien après le traitement...
- Nombreux virus vecteurs à utiliser pour les 750 muscles humains (~40% masse corporelle)
- Tous les muscles n'absorbent pas aussi bien les vecteurs, on pourra améliorer la pénétration par les membres mais pas forcément pour le reste du corps
- La thérapie nécessite un muscle vivant, elle réduit la progression, mais ne régénère pas un muscle disparu...