

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

Yves Bertheau

Université Populaire du XIVème
2017/11/28
Paris



MUSÉUM
NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE



INRA
SCIENCE & IMPACT



CESCO
Centre d'Écologie et des
Sciences de la Conservation



UPMC
SORBONNE UNIVERSITÉS

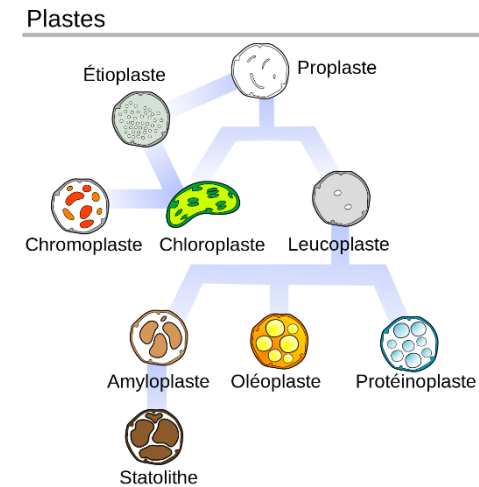
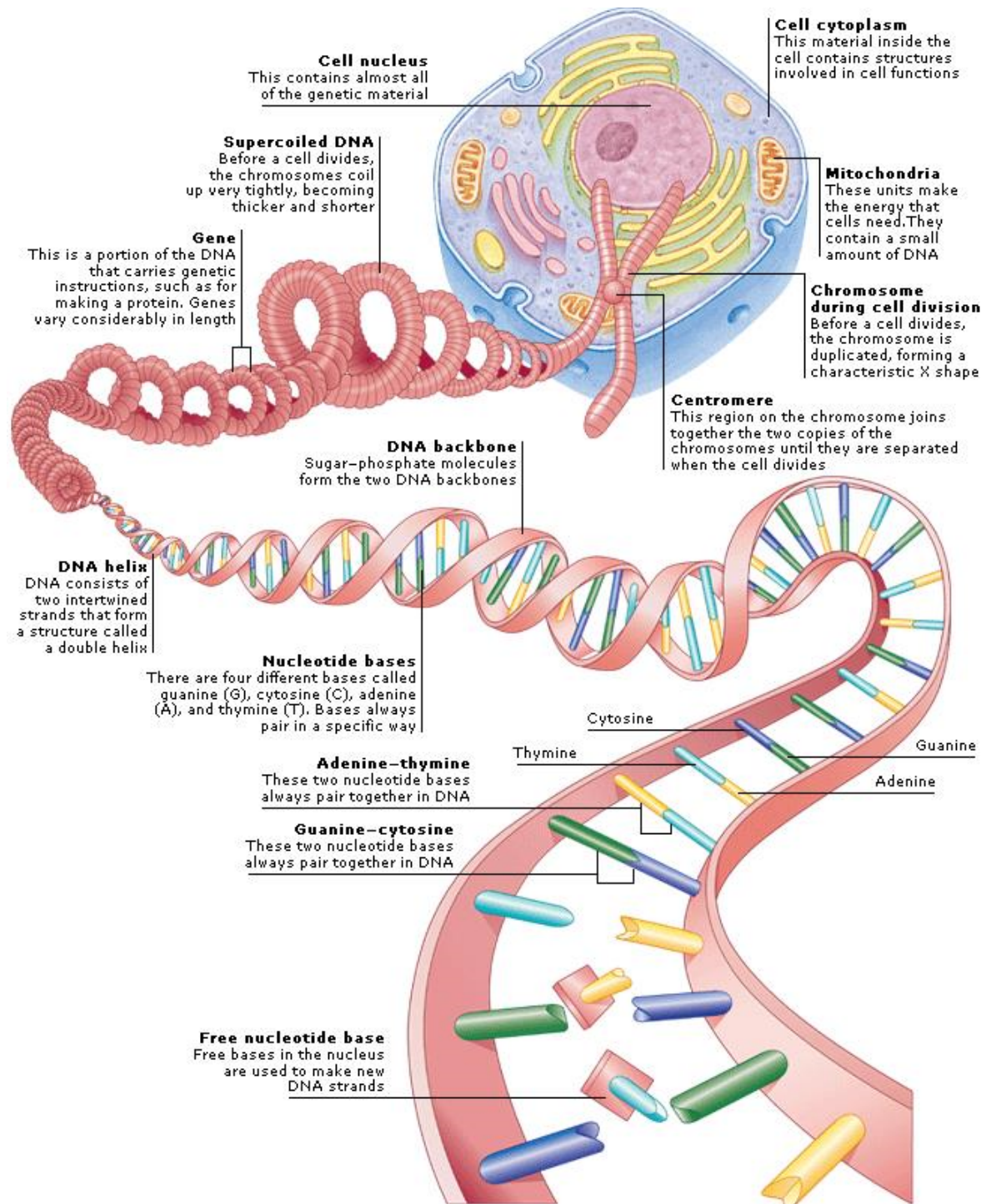
Une progression rapide des techniques

- 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...

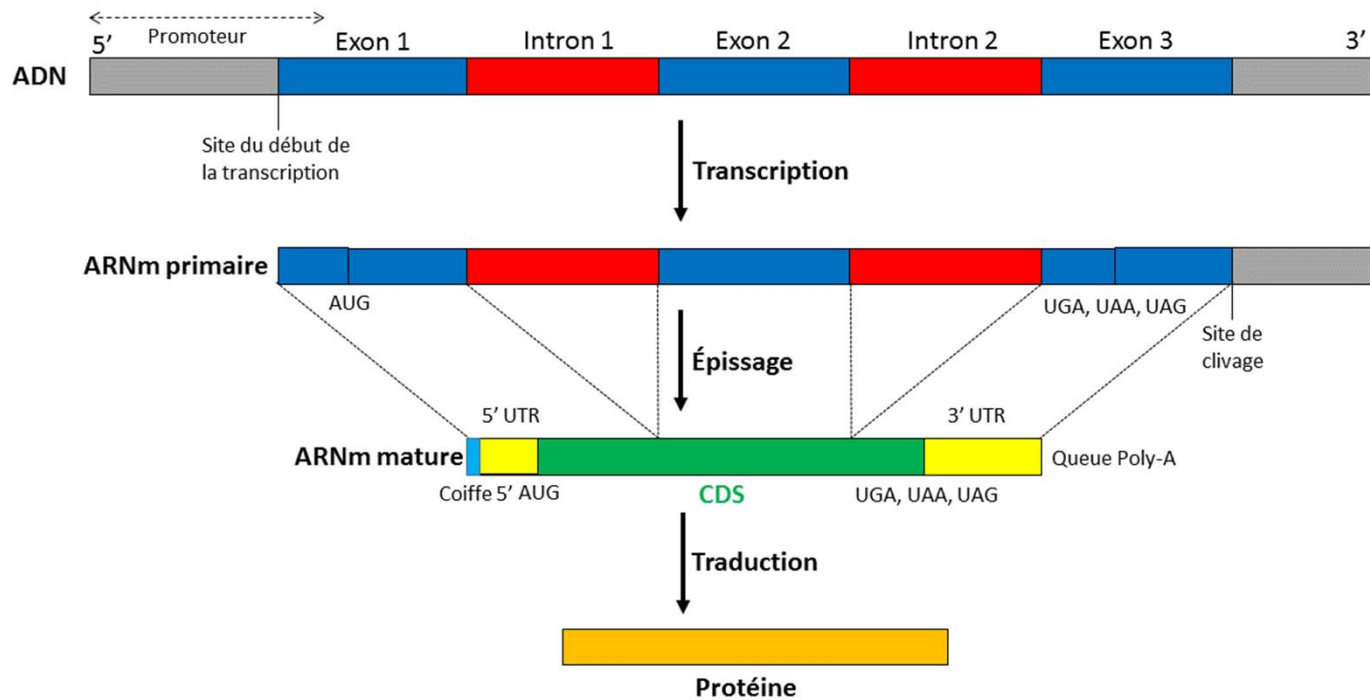
Les NTMGE: une histoire mouvementée...

LA COMPLEXITÉ DU VIVANT

Du nucléotide à la cellule

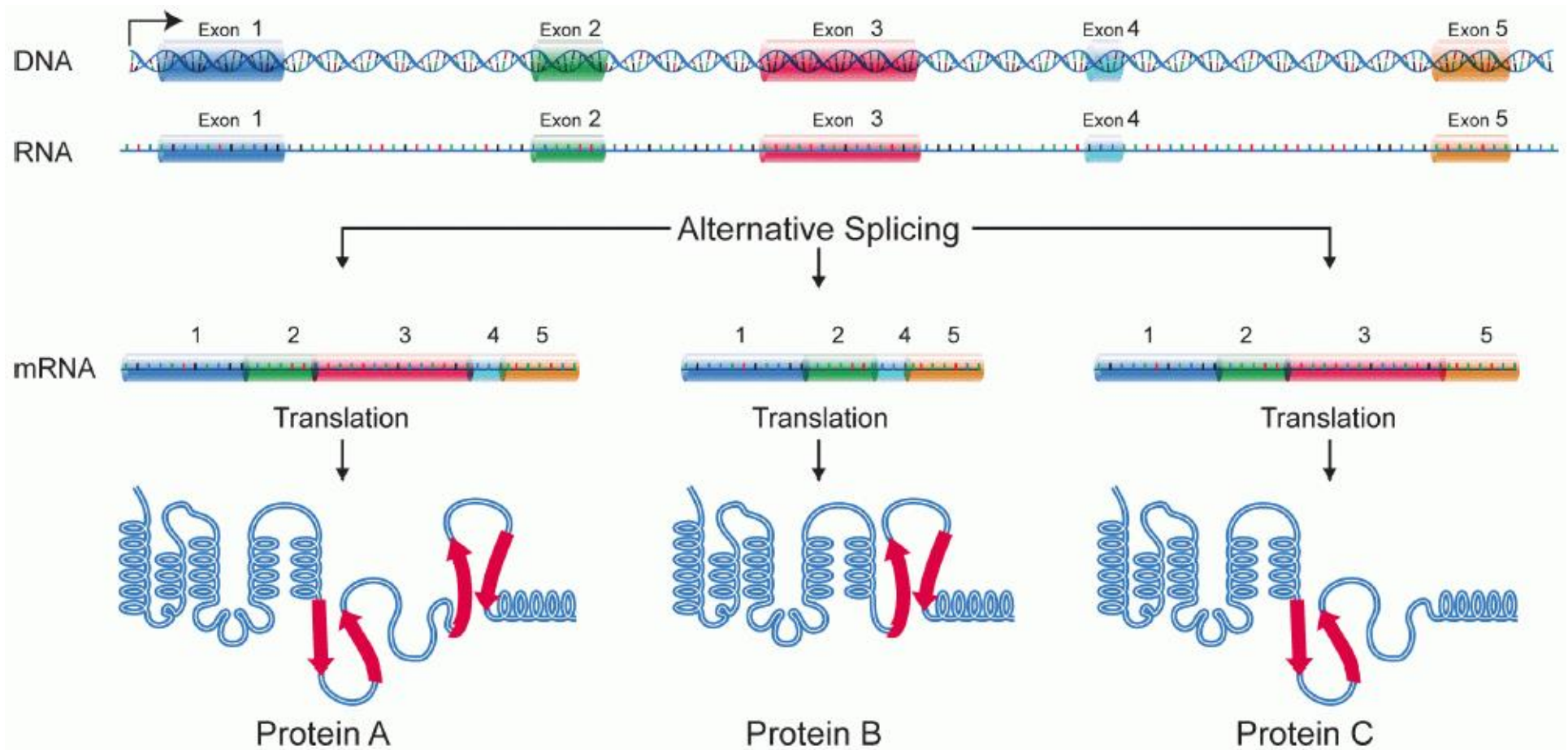


La majorité des considérations porteront sur les noyaux des eucaryotes, pas les génomes d'organites (mitochondries, chloroplastes)



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

Dogme central mais avec épissage alternatif

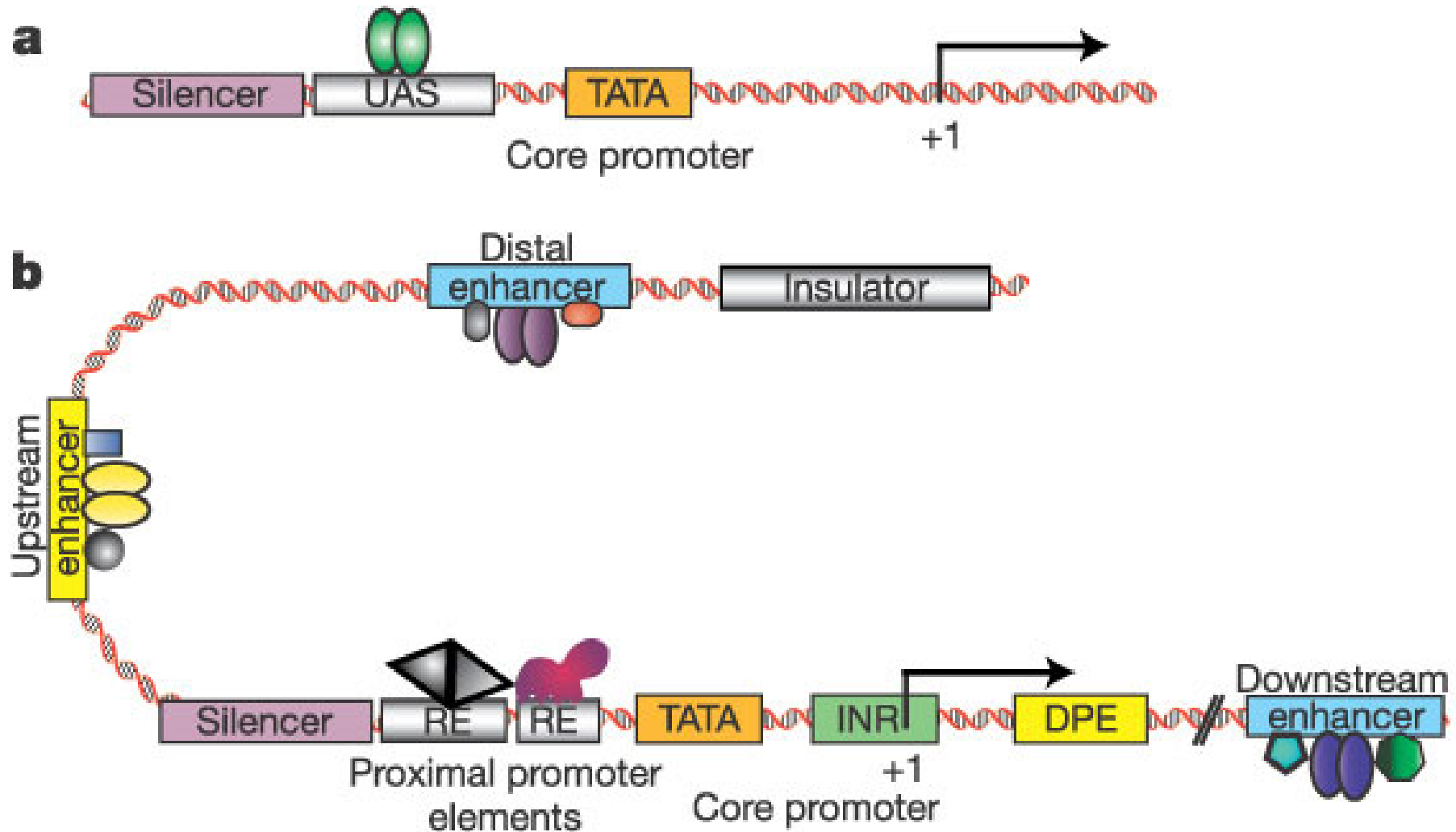


Les transcrits ARN ainsi que leur abondance sont représentatifs d'une cellule X à l'instant T...

Mais en fait :

- L'épissage alternatif engendre de nombreuses isoformes, dont certaines pathologiques
- 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 donnant naissance à des centaines de milliers de protéines

Unité transcriptionnelle eucaryote : bien plus complexe...

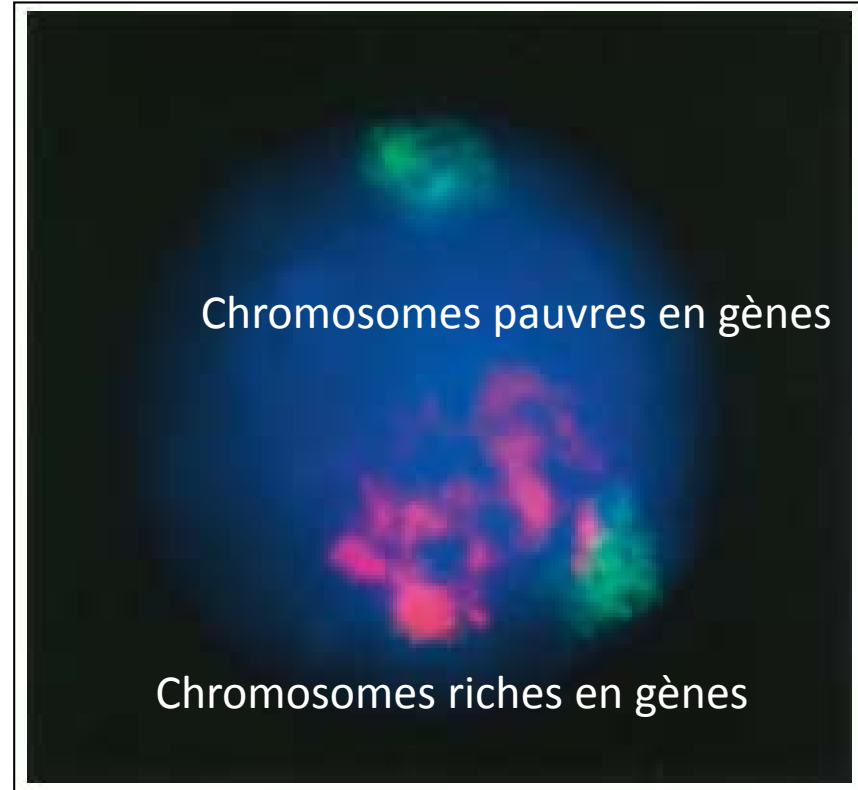


La conception actuelle 3D de la régulation d'expression des gènes et d'organisation des noyaux



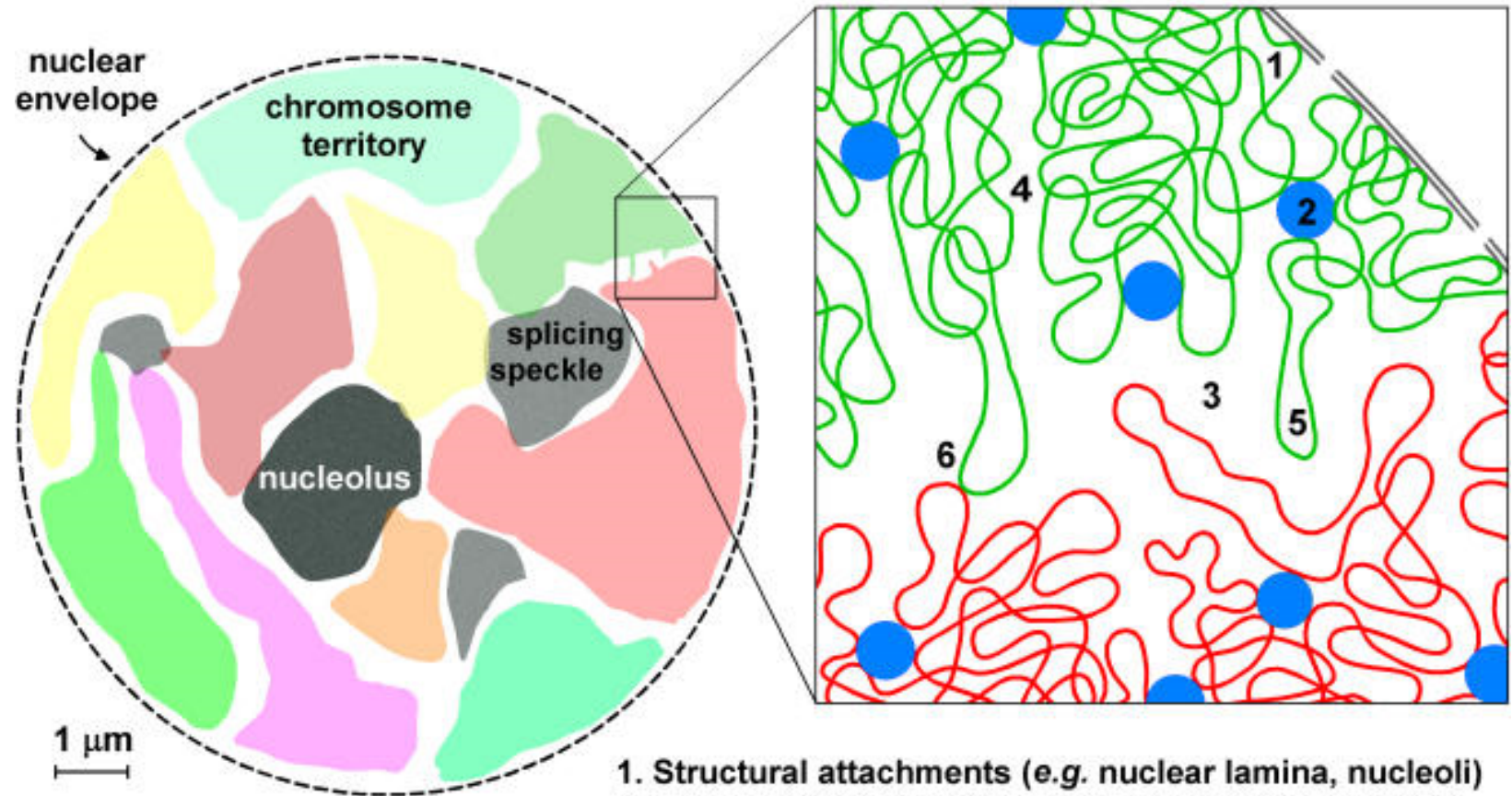
Chromosome territories

Schneider et al. 2007



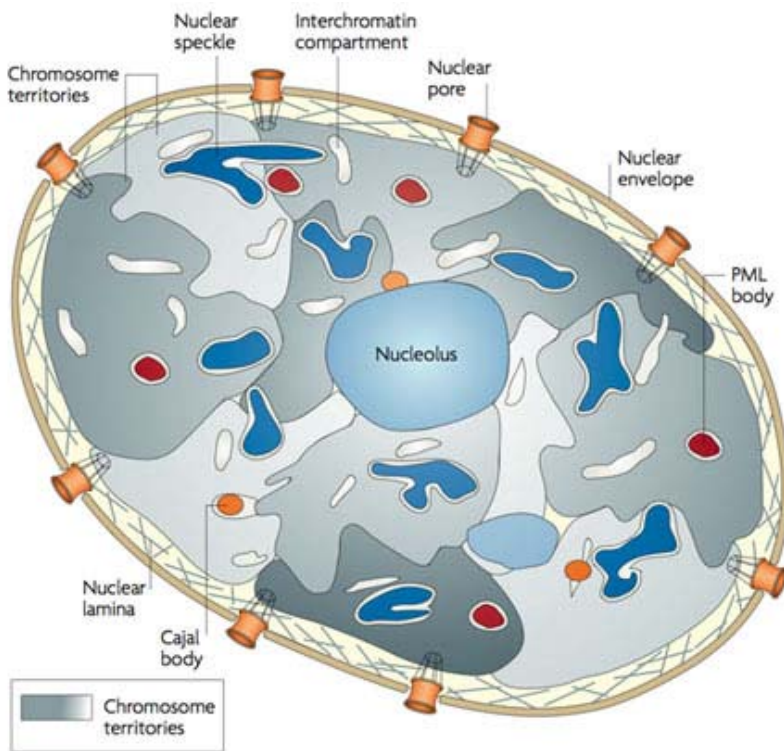
Spector et al. 2003

A. Interchromatin domain model

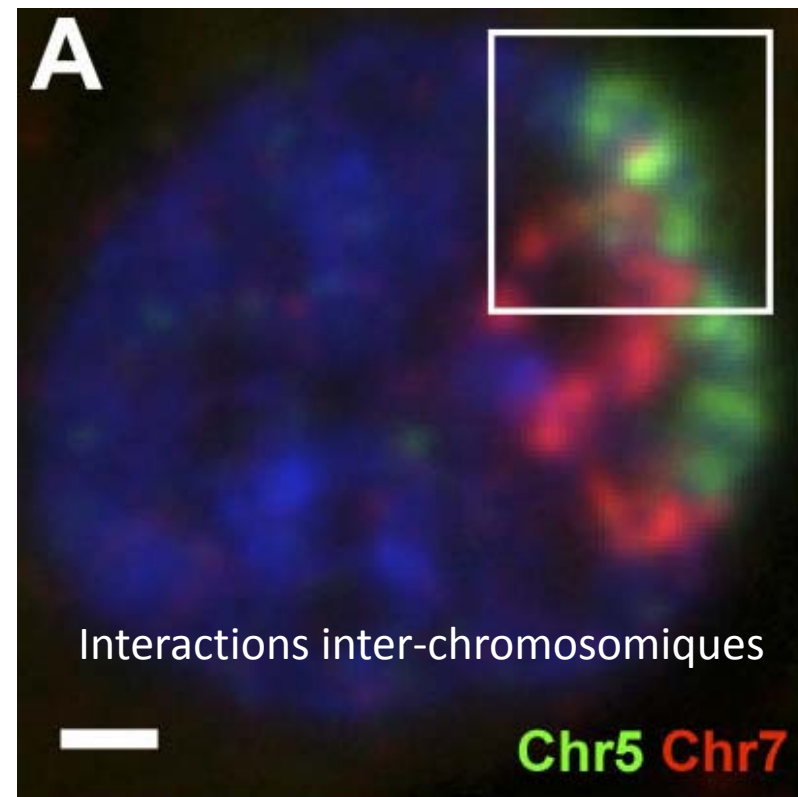


1. Structural attachments (e.g. nuclear lamina, nucleoli)
2. Intrachromosomal contacts maintained by tethering
3. Interchromatin domain (ICD)
4. Intrachromosomal channel
5. Chromatin loop extends out of its territory into the ICD
6. Rare interchromosomal interactions

Domaines inter-chromosomiques

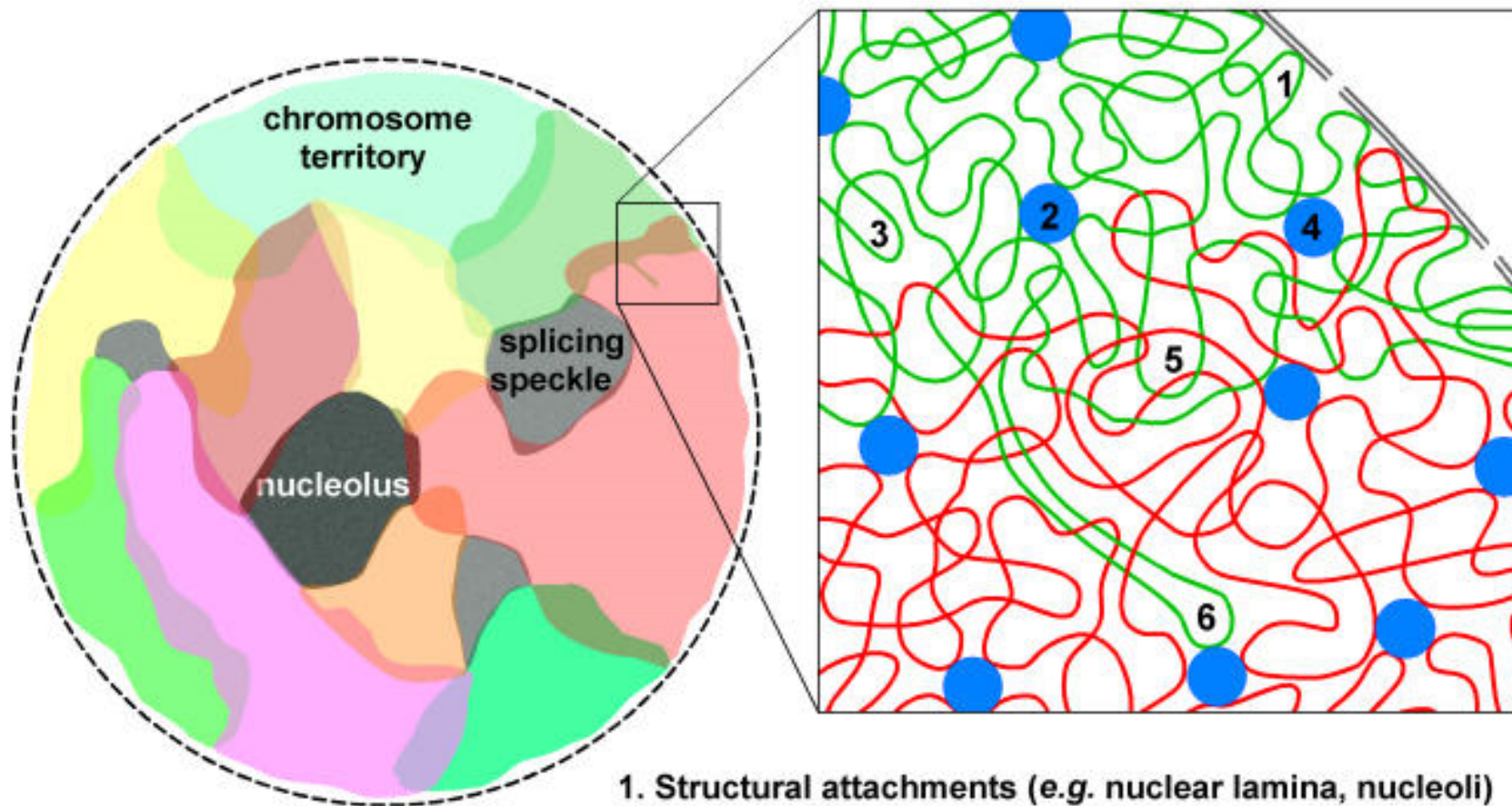


Schneider et al, 2007



Branco et Pombo, 2006

B. Interchromosomal network model

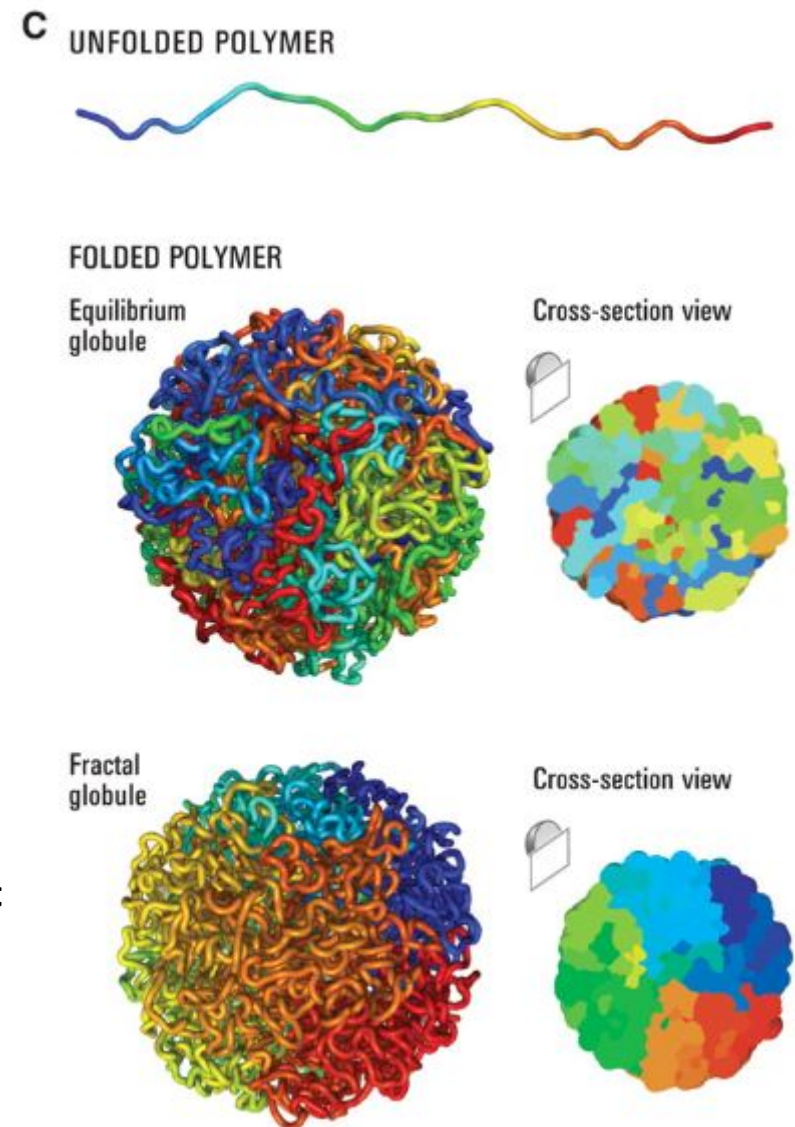


1. Structural attachments (e.g. nuclear lamina, nucleoli)
2. Intrachromosomal contacts maintained by tethering
3. Intrachromosomal mixing by constrained diffusion
4. Interchromosomal contacts maintained by tethering
5. Interchromosomal mixing by constrained diffusion
6. Chromatin loop extends deeper into another territory

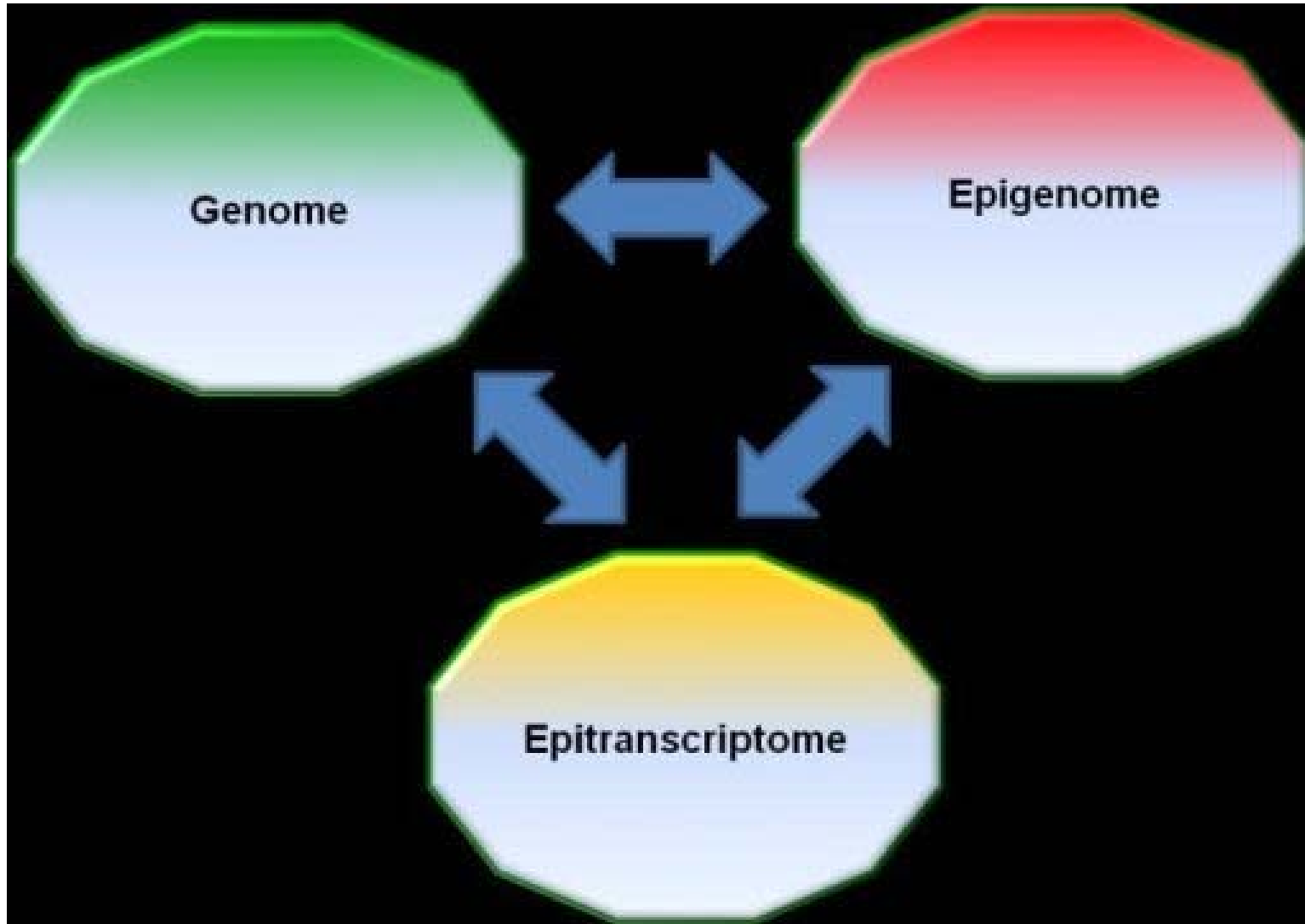
Quelques autres points saillants sur les génomes et épigénomes

- Très larges parts d'ADN non codant, ex: homme 95%, impliqué dans la régulation d'expressions des gènes (appelé il y a peu: « junk DNA »)
- « Matière noire » (gènes « manquant »)
- Peu de corrélations entre régions linéaires et spatiales
- Épigénomes (ADN, ARN et Protéines – histones et non-histones): on commence tout juste à savoir d'où partir (cf. colloque EFSA Juin 2016)

On est très loin de la biologie moléculaire mécaniste et linéaire des années 70-80



En conclusion : des interactions complexes entre domaines encore très mal connus

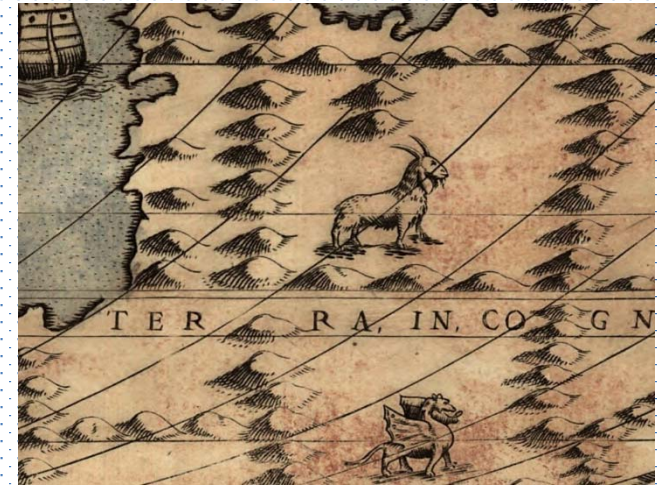
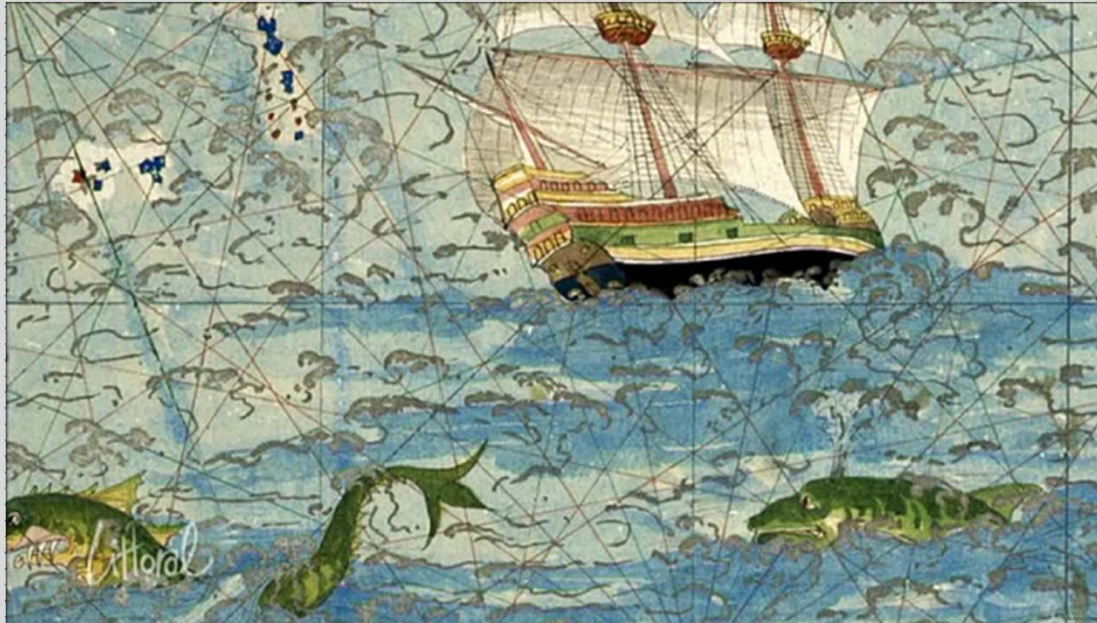


La modification de l'un d'eux peut entraîner des effets sur les autres difficilement discernables

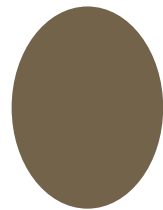
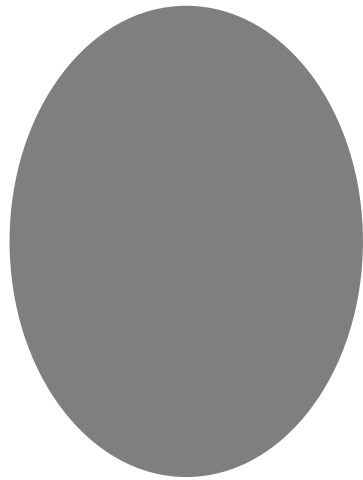
Circulation des informations via les acides nucléiques: un monde fabuleux à découvrir...

- ADN et ARN circulent tant dans le sang, le placenta que le phloème des plantes: sources d'information et d'expression de gènes dans des parties distales,
- Échanges d'acides nucléiques avec les plantes parasites, sources d'adaptation et de co-évolution,
- ARNm de la nourriture régulant des gènes de l'animal,
- *C. elegans* : transports de petits ARN vers l'intérieur des cellules,
- Épimutations se transmettant aux descendants prises en compte dans les programmes de sélection variétale, elles 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 :
à la découverte de nouvelles
Terra incognita...



Mais avons-nous les boussole, astrolabe et portulan pour ces aventures ?

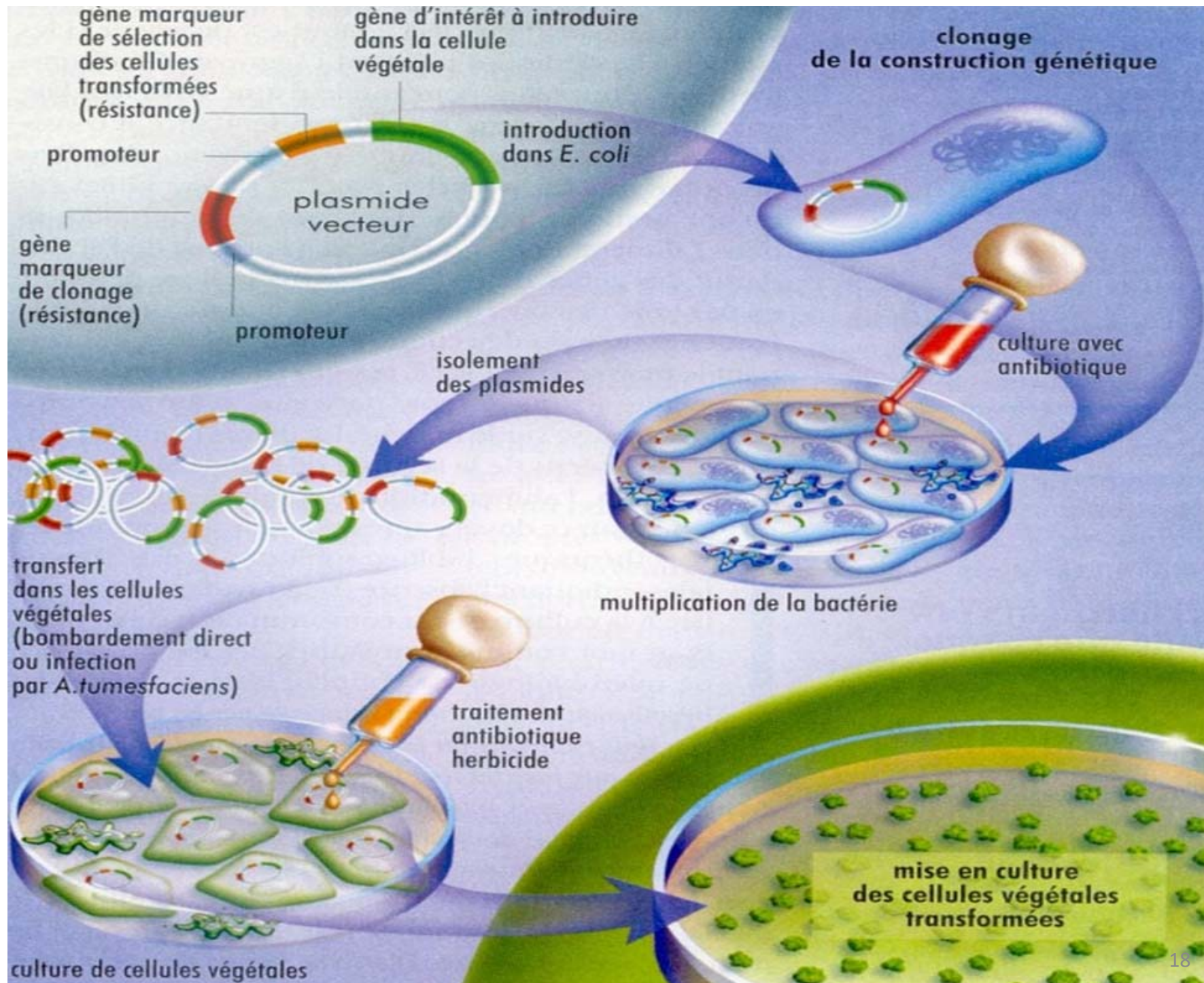


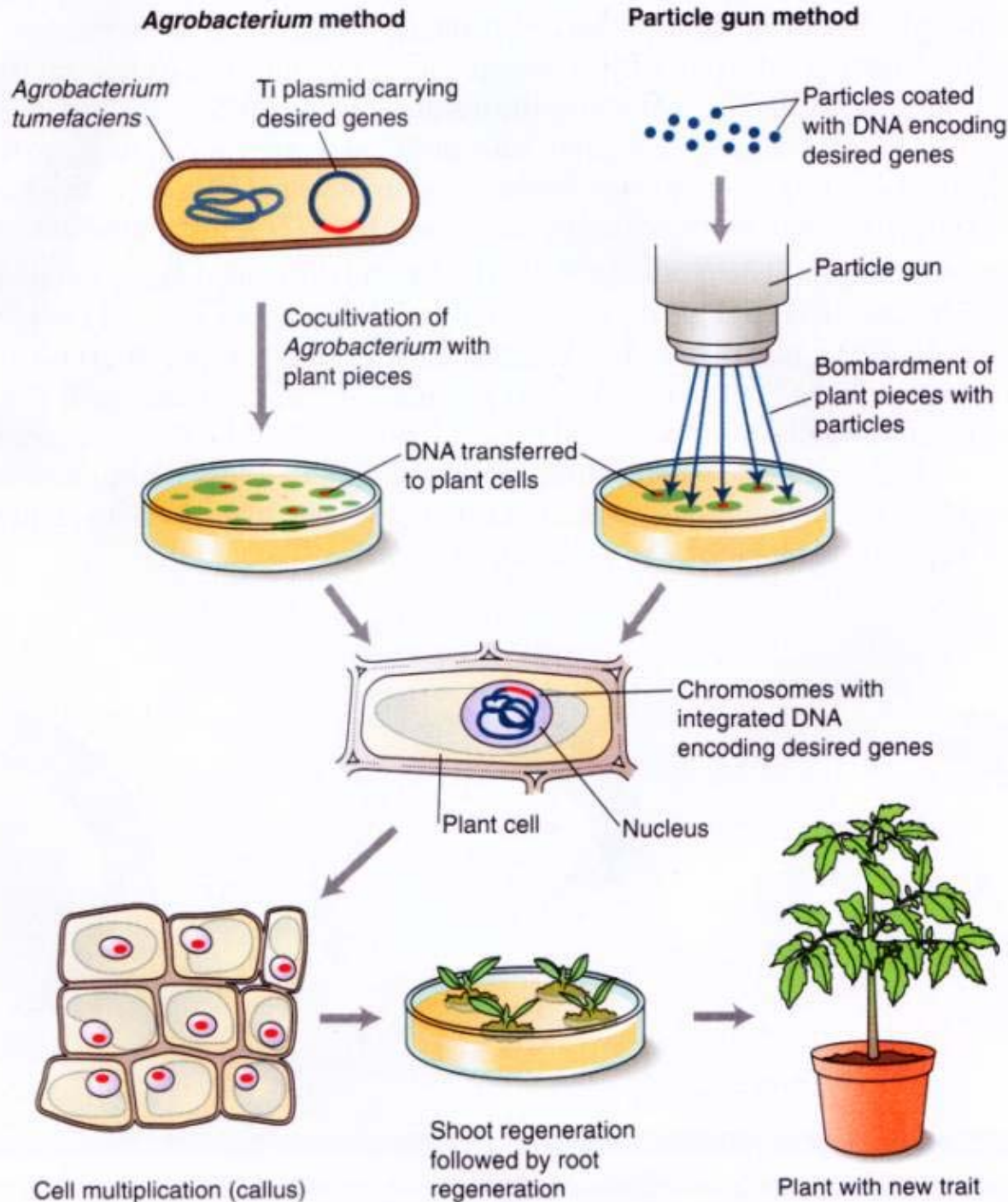
Les NTMGE...

Mais comment parvient-on
aux fabuleux changements
annoncés?

LES TECHNIQUES CONNEXES

(OU COMMENT FAIRE PARVENIR LES RÉACTIFS NTMGE AUX SITES D'ACTION, LES FAIRE AGIR, SÉLECTIONNER LES QUELQUES CELLULES TRANSFORMÉES, ÉLIMINER LES SYSTÈMES DE SÉLECTION ET TENTER DE RÉGÉNÉRER DES PLANTES...)





Agrobacterium: bactérie phytopathogène avec de nombreuses infections avortées observées chez les végétaux (ex: patate douce), comme pour d'autres maladies par ex. dues à des virus...

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 ce type de publications, source de savoir-faire pour les firmes ...

Les étapes de la transgénèse

Identifier
un gène d'intérêt
sur un organisme donneur



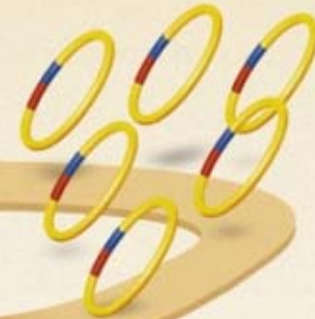
Isoler
le gène d'intérêt



Intégrer
le gène d'intérêt dans une
construction génétique



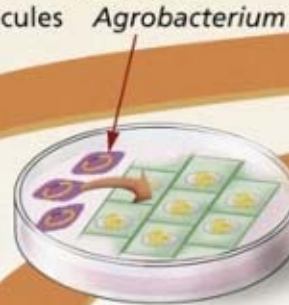
Multiplier
la construction
génétique



Transfert direct



**Transformation
biologique**



Transférer
le gène



**Sélection des cellules
transformées**

Régénérer



Évaluer
l'expression
du gène

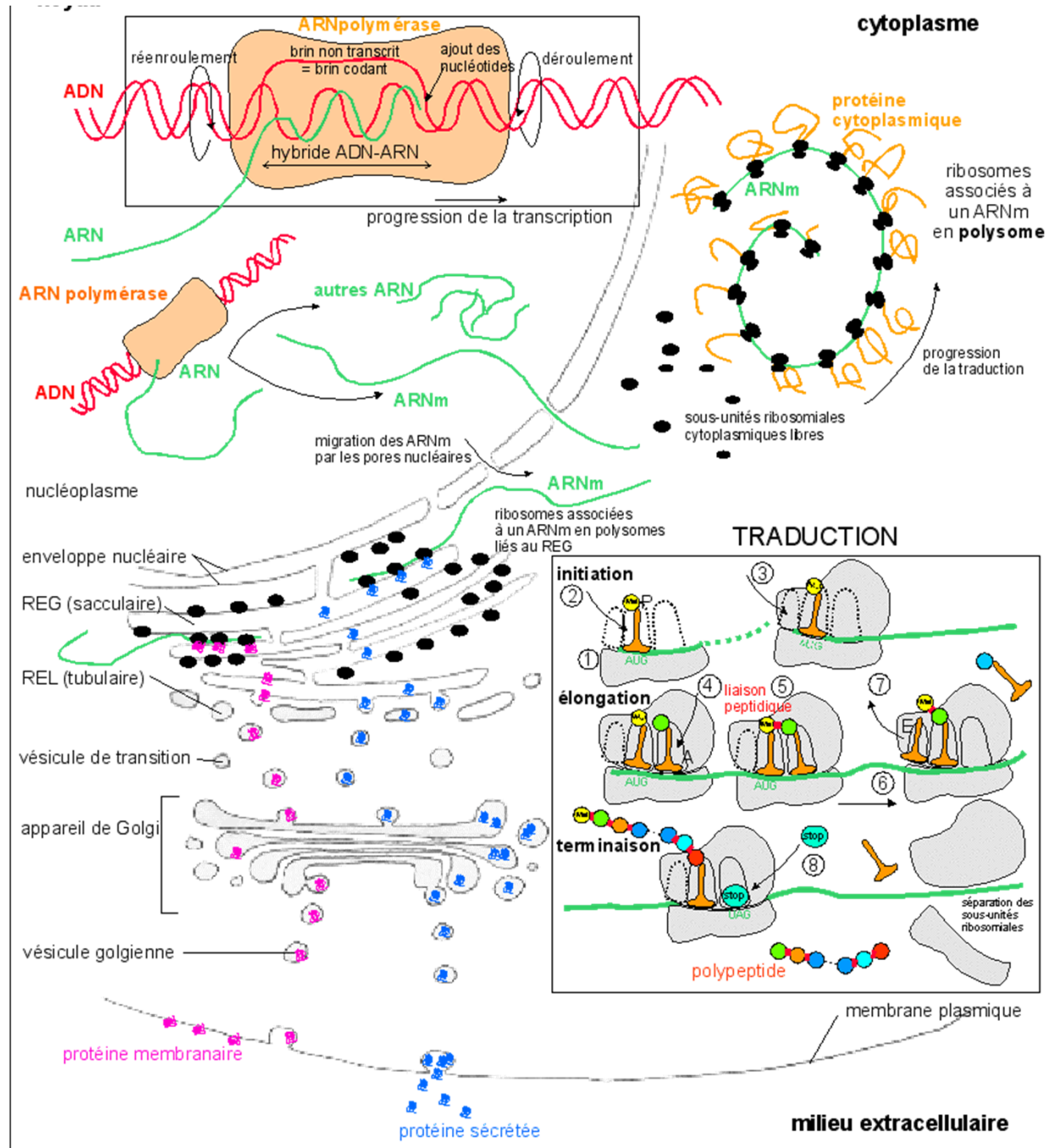


Incorporer
par des croisements
dans une variété
commerciale



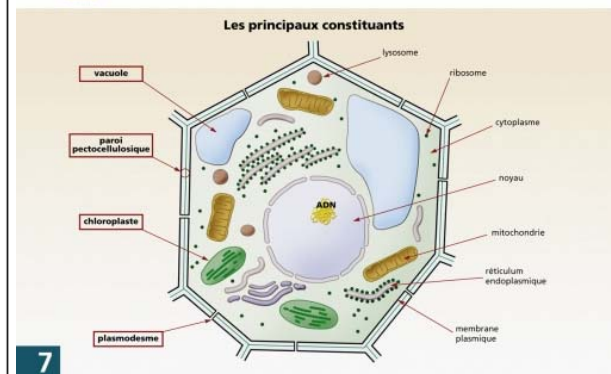
Les différents compartiments cellulaires (membranes...) affectés par les techniques connexes :

de nombreux dommages collatéraux !!!



gnis

La cellule végétale



Les techniques connexes

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

- protoplastisation, vectorisation (virus, particules de biolistique, bactéries comme *Agrobacterium...*), cultures cellulaires, systèmes de sélection des cellules modifiées et leur élimination, 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 »...



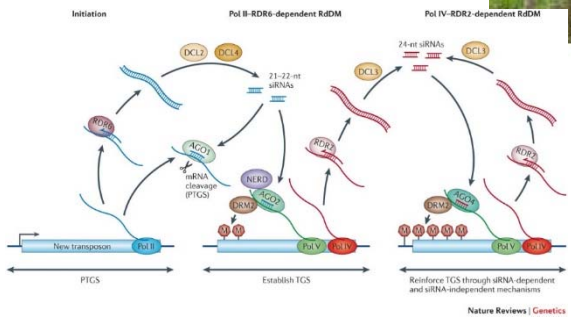
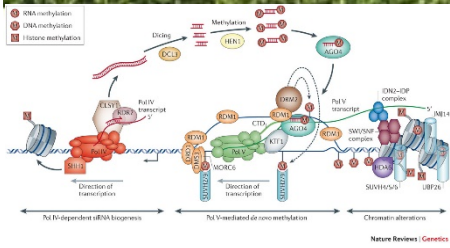
**Conventional
Apple Variety**



**Arctic®
Apple Variety**



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



LES TECHNIQUES NTMGE

**(DE LEURS EFFETS NON INTENTIONNELS AVEC APPORTS INATTENDUS
D'ACIDES NUCLÉIQUES CONTAMINANT)**

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 ses aspects « positifs » (ex: JKI)



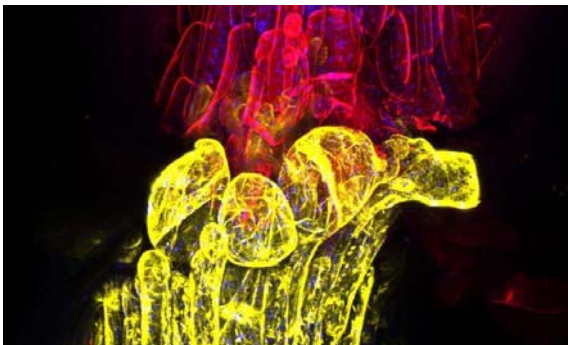
Crispr-Cas9 et consorts

Greffage : un technique ancestrale « modernisée » avec d'importantes interactions entre scion et porte-greffe

- Circulation de pathogènes, protéines (e.g. Cry1Ac), ADN, ARN, hormones...
- Régulation d'expression (silencing...), synthèse de protéines dans les scions...
- Les génomes communiquent entre eux avec constitution d'épialleles.

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



"Grafting is something done often in the commercial world, and yet, we really don't completely understand the consequences for the two plants," says Joseph Ecker, one of the senior authors of the paper and director of Salk's Genomic Analysis Laboratory. *"Our study showed genetic information is actually flowing from one plant to the other. That's the surprise to me."*

Sam van Aken, Syracuse University, New York.



CRISPR-endonucléases :

les dernières nées

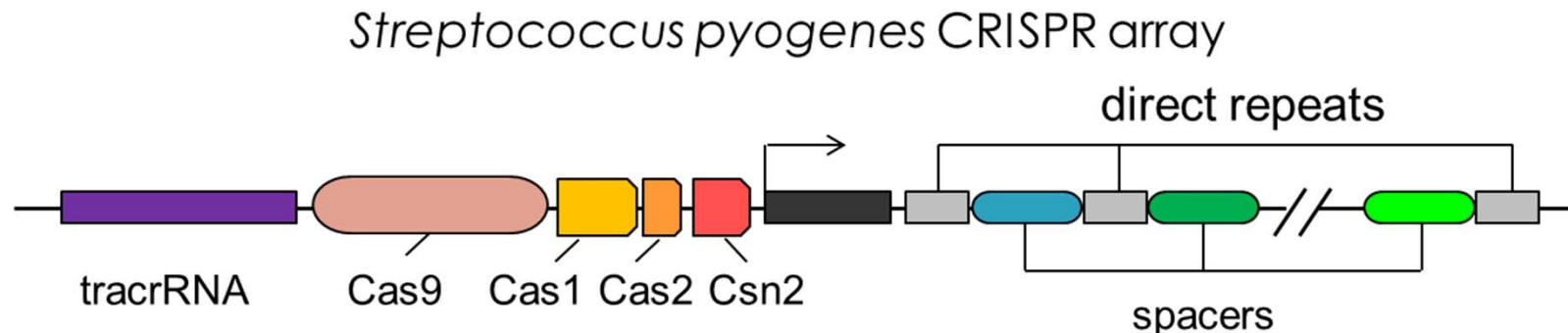
(6 classes, 19 sous-classes aux fonctions peu ou totalement inconnues et de nombreuses variantes par modifications des systèmes naturels)

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

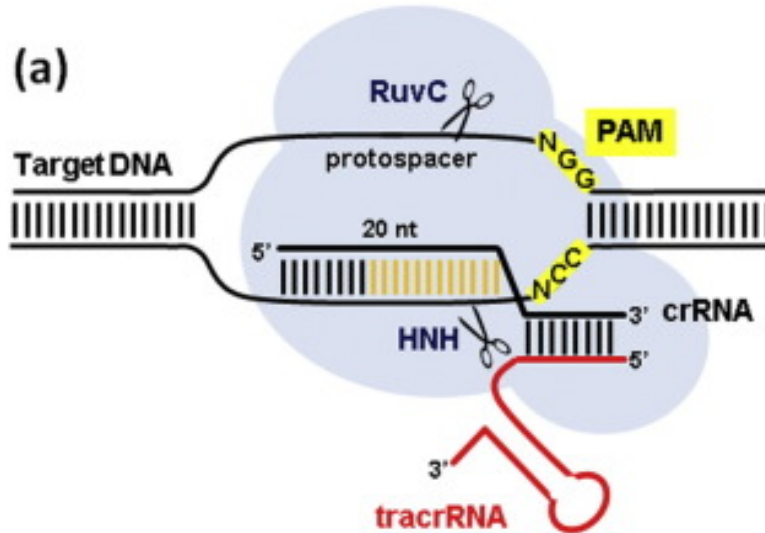
Convergences évolutives chez les animaux et les plantes avec des systèmes de stabilisation des génomes ex: ARNpi et éléments transposables, petits ARN et DICER...

Objectif fondamental : lutter contre les ADN invasifs

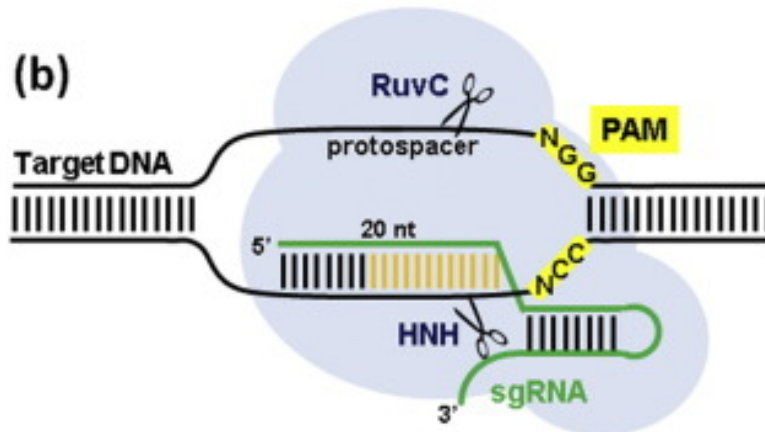


Crispr-Cas9/endonucleases : modifications des génomes et épigénomes

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

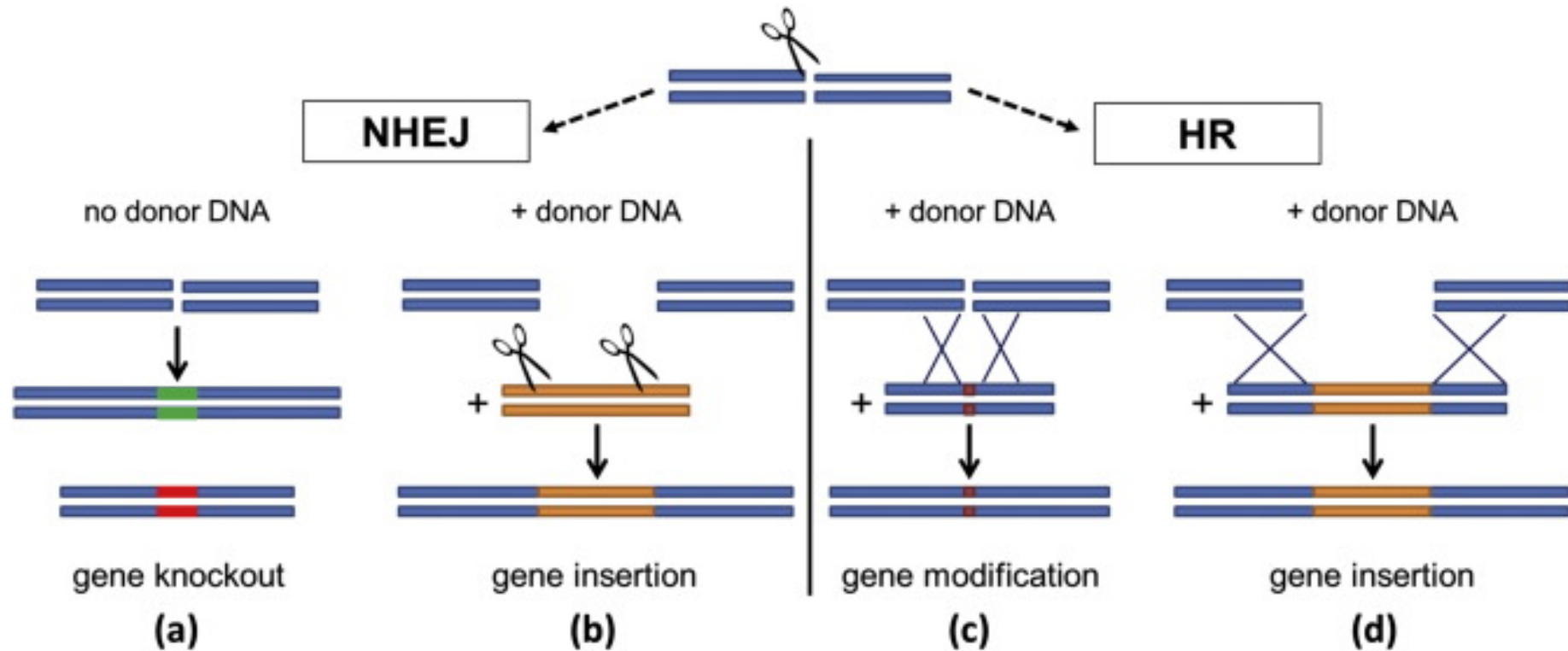
Effets non intentionnels:

- 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
Difficult to master

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...

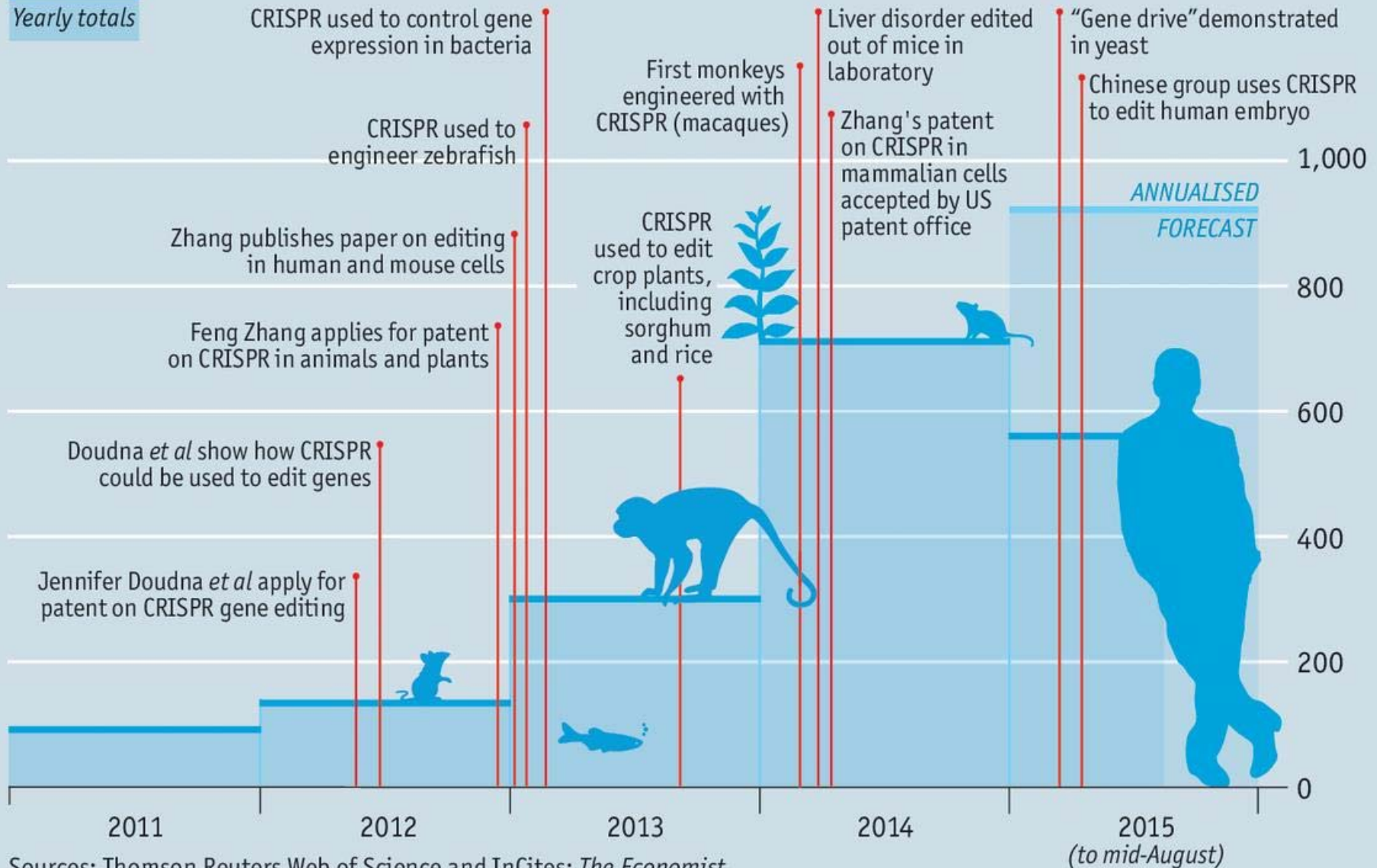
Luisa Bortesi, Rainer Fischer *Biotechnology Advances*, Volume 33, Issue 1, 2015, 41–52

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*



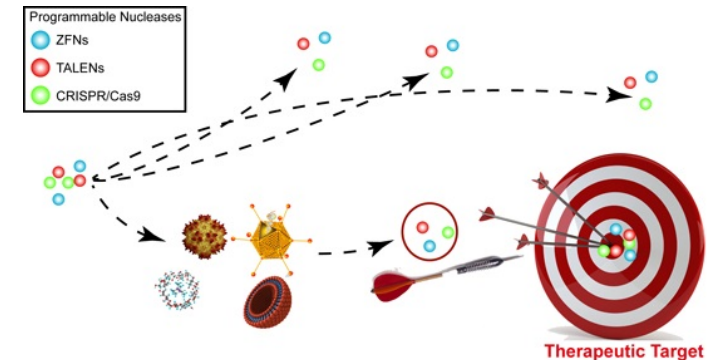
Les off-targets

D'abord s'entraîner...

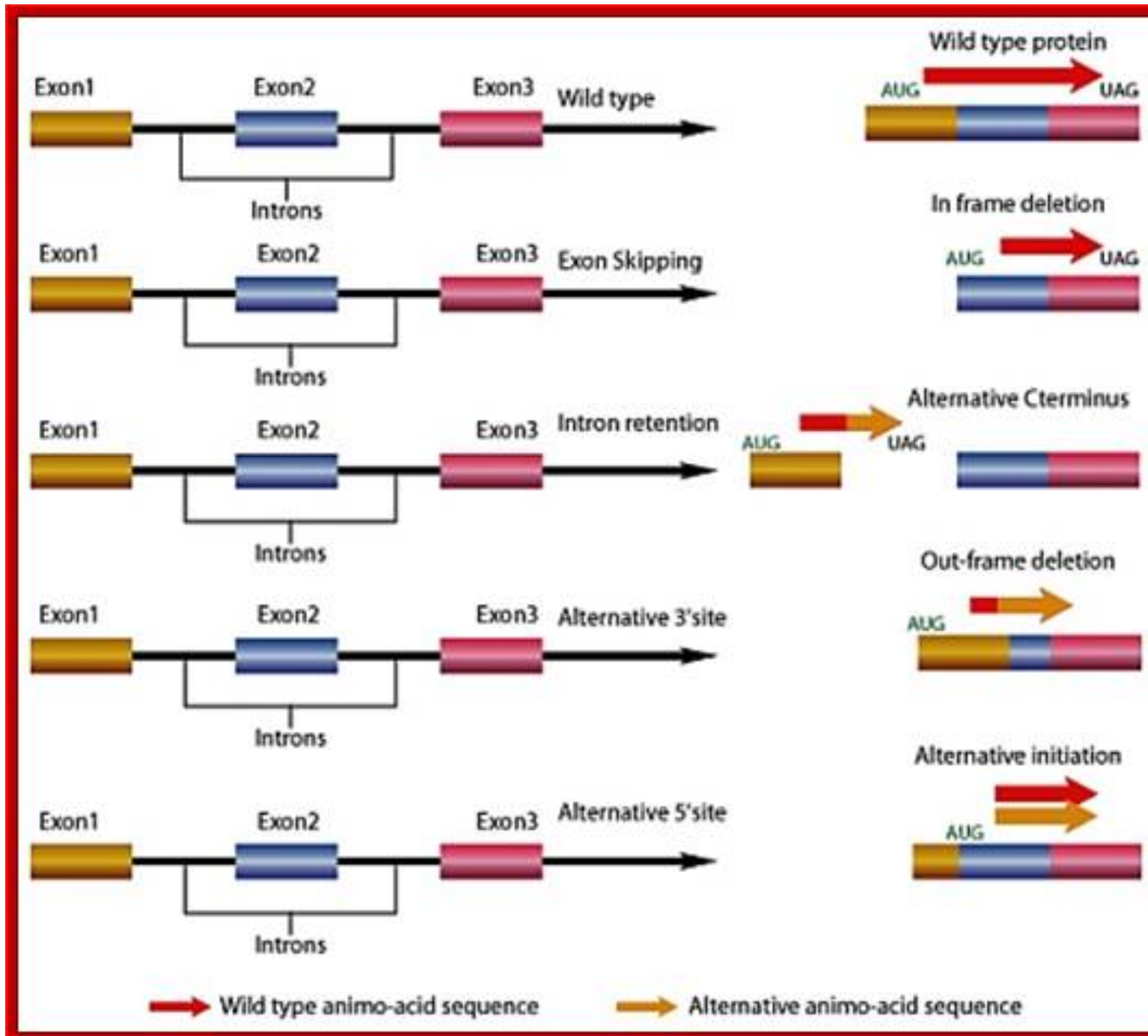
Ensuite se lancer... pour en rater pas mal...

- De nombreuses homologies totales ou partielles dans le reste du génome,
- Des considérations thermodynamiques,
- De nombreuses recettes de cuisine pour tenter de réduire le nombre de off-targets (facteur 1 500...)

En conséquence : des insertions / délétions ponctuelles ou non, des réarrangements chromosomiques (inversions, translocations...) difficiles à prédire et détecter...

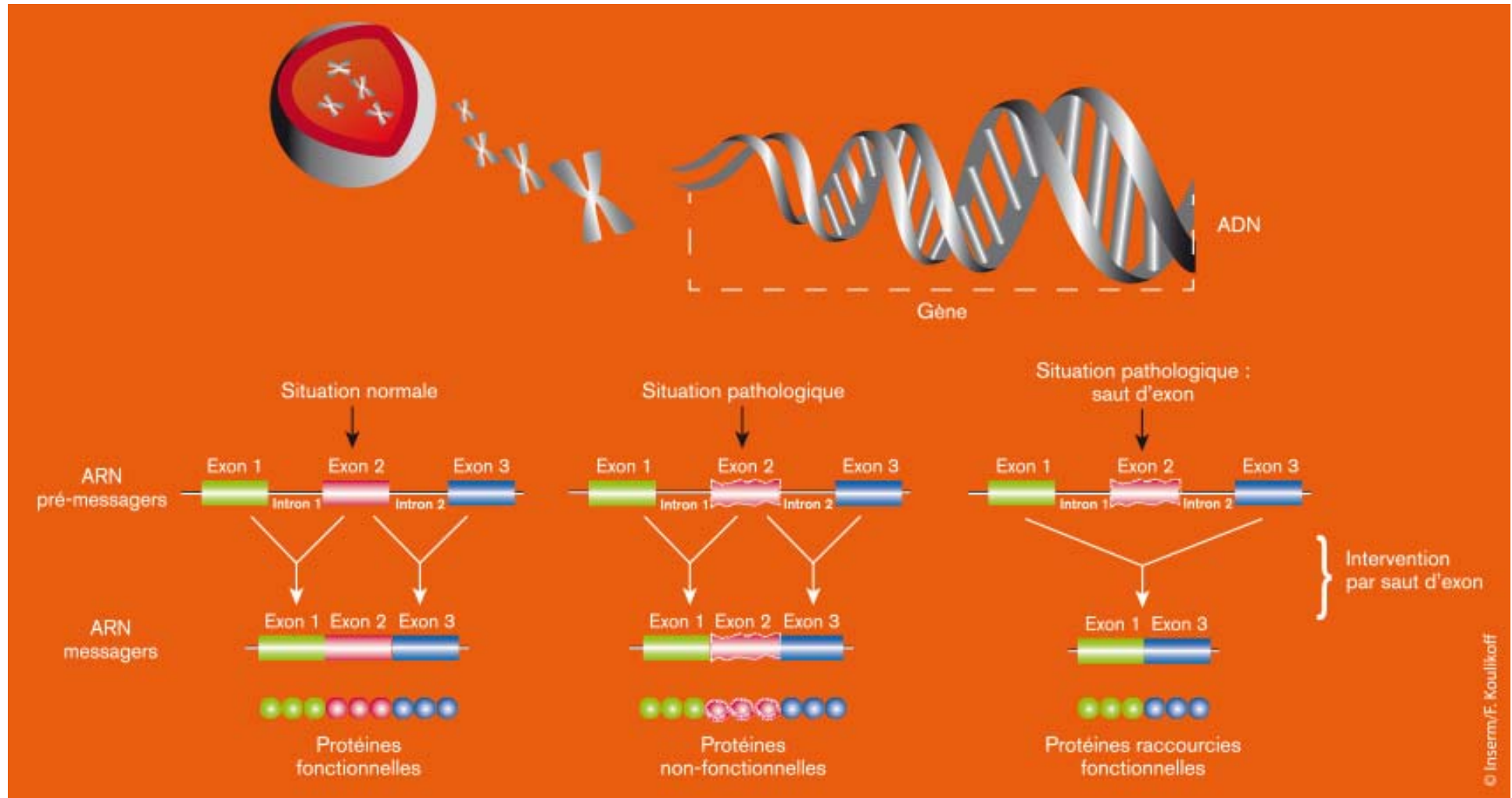


Les sauts d'exon: un ensemble d'effets non intentionnels sur les protéines difficiles à détecter



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

Sauts d'exon: des protéines fonctionnelles ou non, pathologiques ou pas



Aucune ligne directrice d'études et pas de prises en compte dans les évaluations de risques

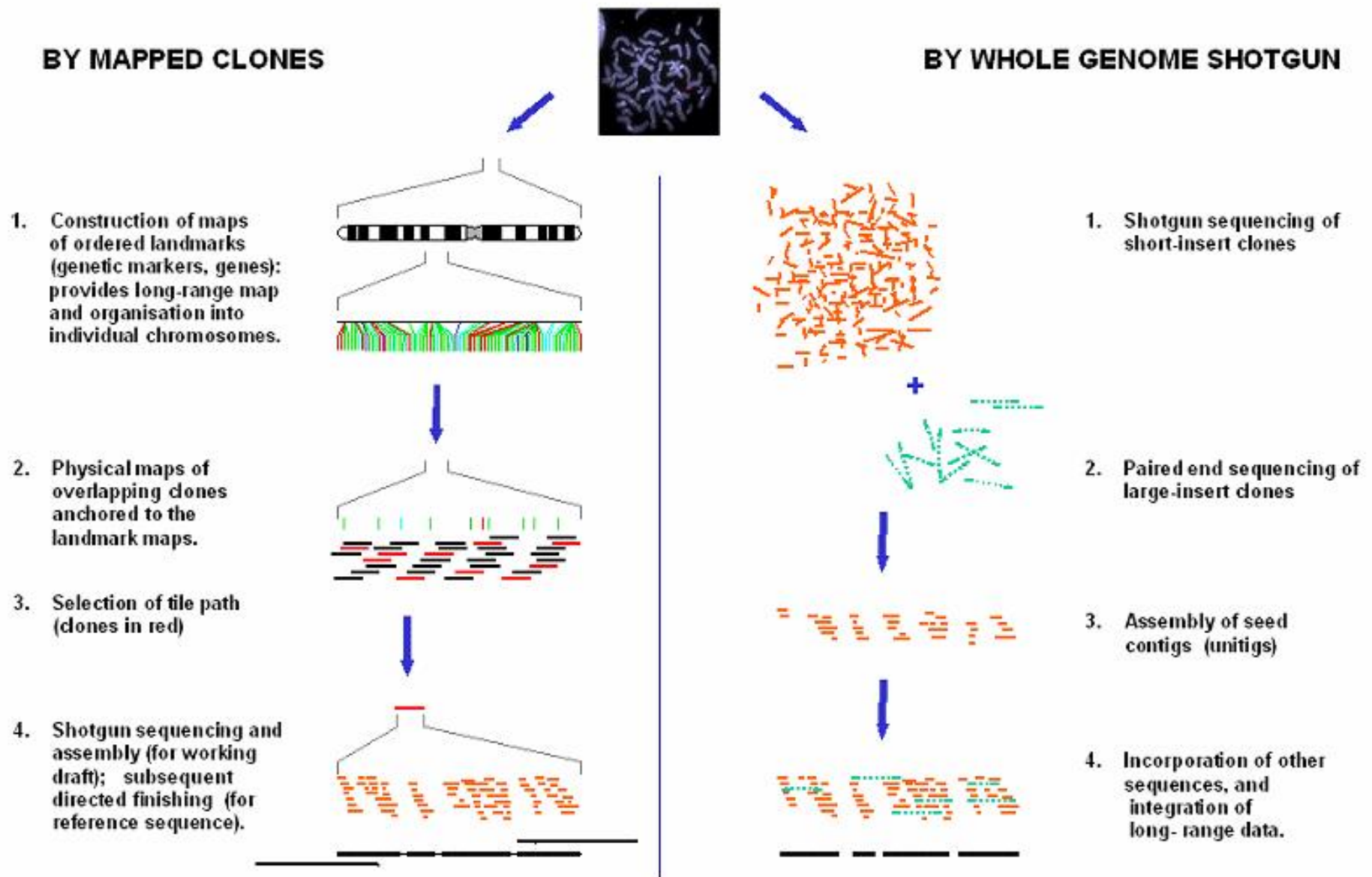
TENTATIVES D'ÉLIMINATION DES MUTATIONS ÉPIMUTATIONS, OFF-TARGETS...

(DES OUTILS LIMITÉS AVEC UNE FIABILITÉ FAIBLE DE VÉRIFICATION DE LA PURGE)

« 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. »

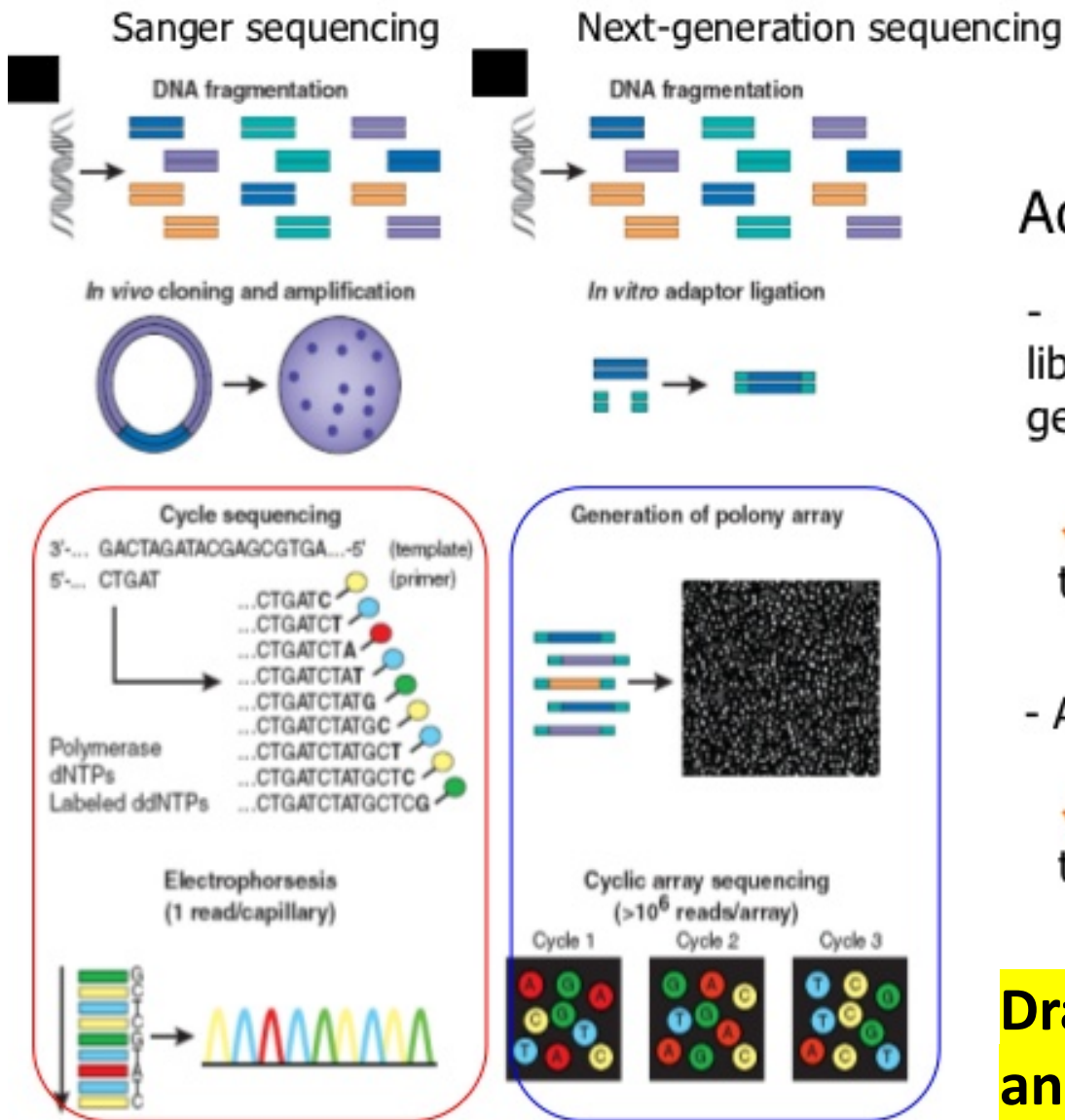
In « La bataille de l'ADN », Laurent Alexandre, Le Monde, Sciences & Médecine, 2016/06/08 page SCH7

STRATEGIES FOR SEQUENCING THE HUMAN GENOME



Séquençage : des techniques, plateformes, références et logiciels aux nombreuses faiblesses

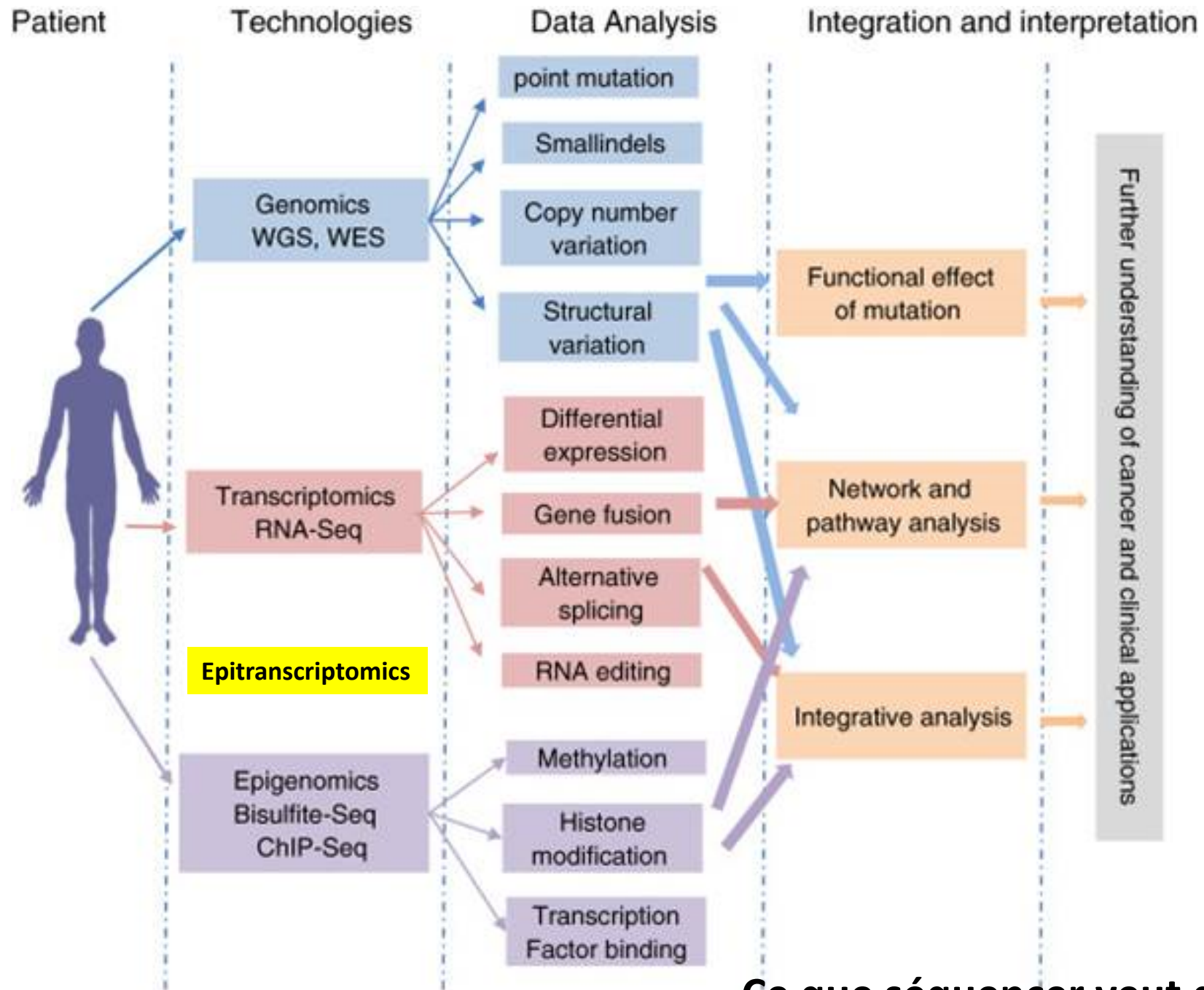
Next-generation DNA sequencing



Advantages:

- Construction of a sequencing library → 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 and not as cheap as claimed



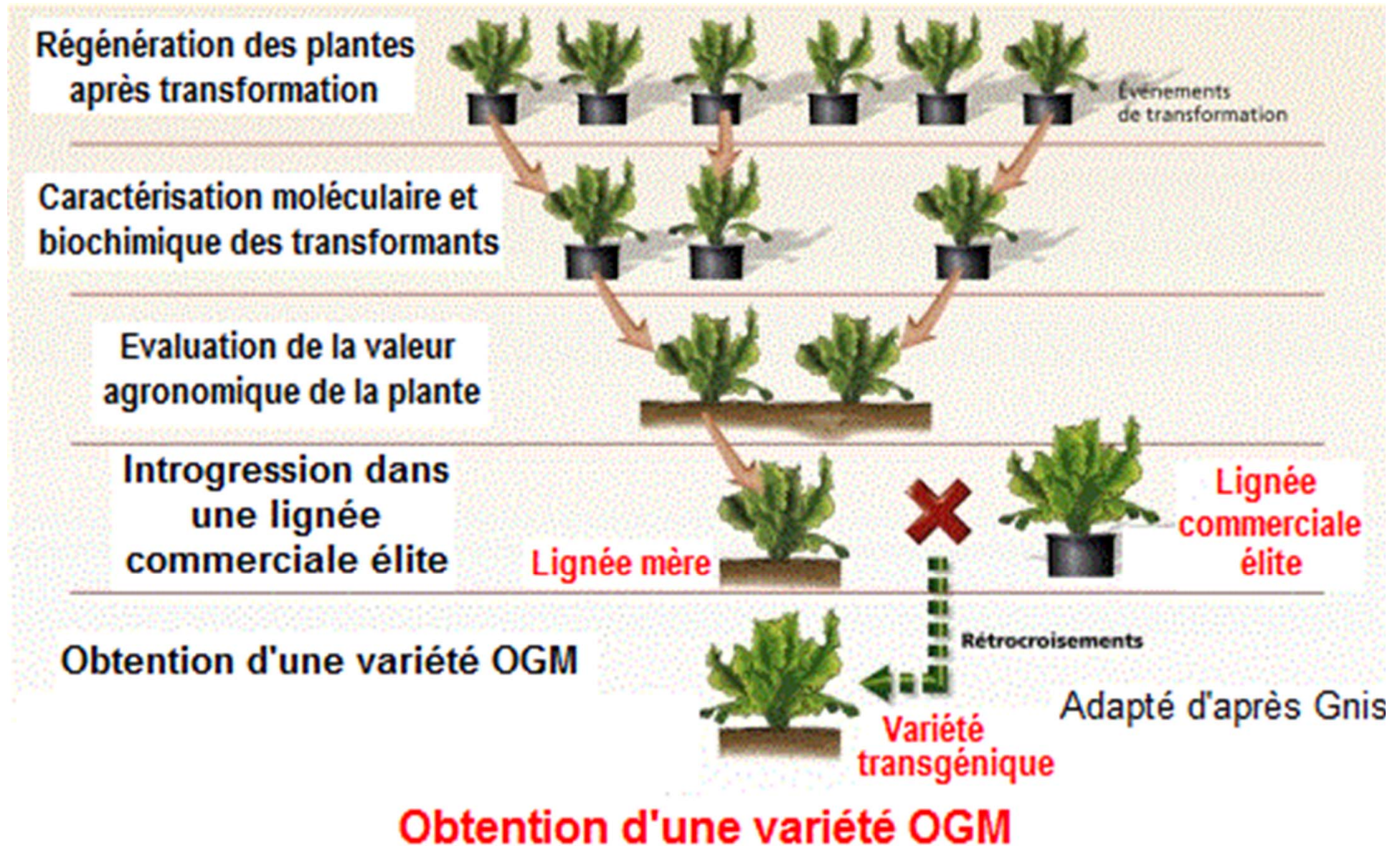
Ce que séquencer veut dire...

Séquençage: des étapes cruciales pour un résultat pas toujours fiable...

- La qualité de l'ADN extrait,
- 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...

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

Après les modifications, les rétrocroisements...



« 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

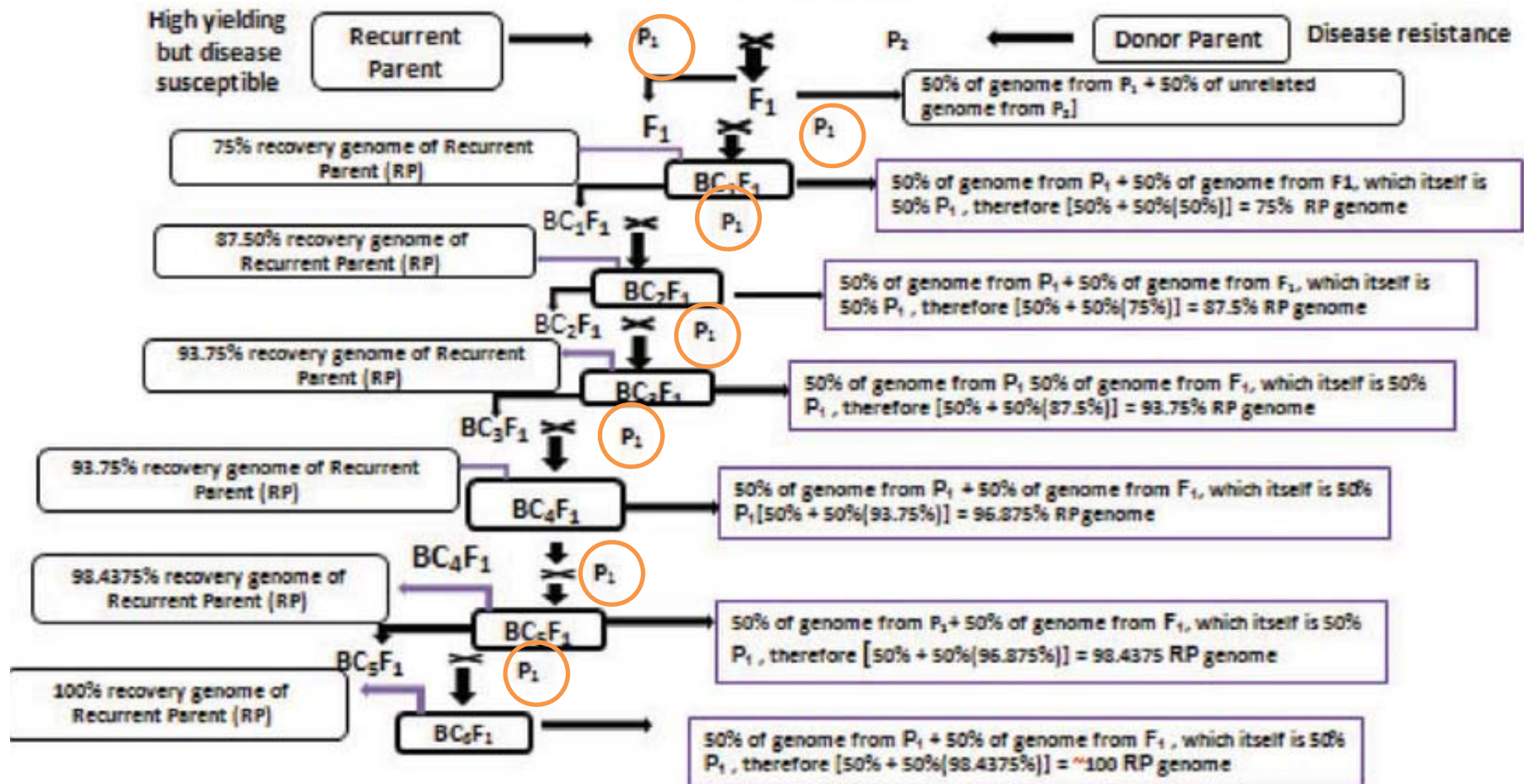
Problèmes avec les NTMGE

- un recours majoritaire à des systèmes de réparation haute fréquence 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),
- Des modifications épigénétiques très mal appréhendées en séquençage, alors qu'un colloque de l'EFSA concluait en juin 2016 que les scientifiques commencent à savoir où travailler.
- Même chose pour les modifications de l'épitranscriptome encore moins bien connues...
- 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 pour tenter de vérifier que la modification phénotypique observée résulte réellement de la modification NTMGE visée

Problèmes avec les NTMGE

- Insertions ou modifications d'ADN semblent s'accompagner systématiquement de modifications épigénomiques (ADN et ARN) proches et distales,
- Des logiciels de prédictions (et détection) des off-targets (distaux) encore peu fiables, quelquefois spécifiques de lignées cellulaires,
- Aucun travail ni ligne directrice pour détecter et examiner l'effet des sauts d'exon,
- 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 on les techniques Crispr 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)...

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;

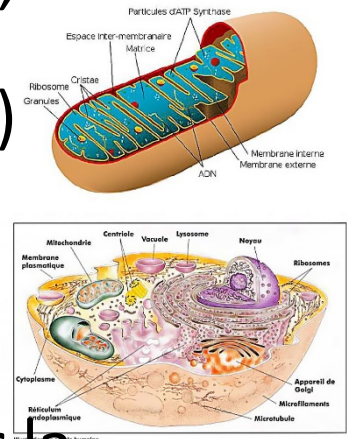
for the BC₂, n=2;

for the BC₃, n=3, etc.

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

Elimination d'effets non intentionnels 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 à comportement non mendélien,
- 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.



QUELLE ÉVALUATION DES RISQUES?

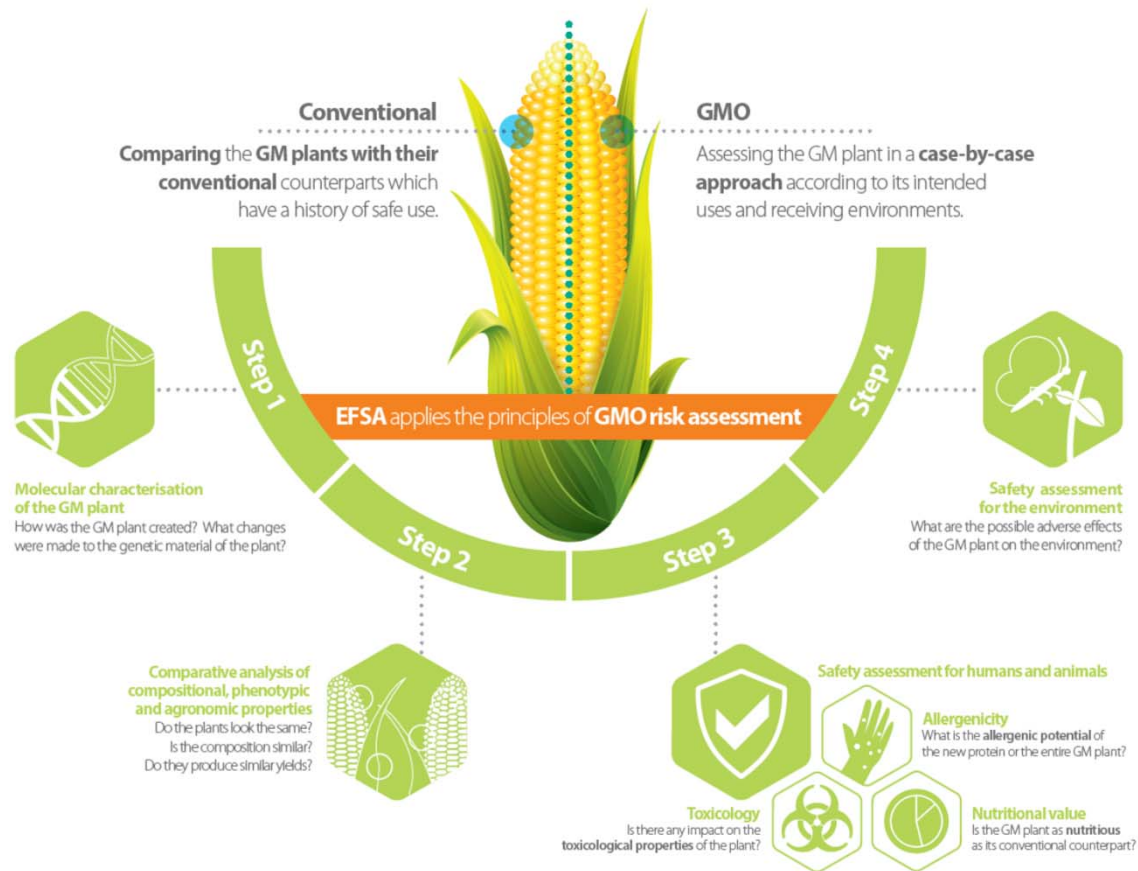
Risk assessment of genetically modified plants



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 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 à une mutation naturelle que si on étudie tout le génome pour les modifications in
- Absence de lignes directrices d'évaluation pour l'épigénétique. 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
 - 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: plante tolérante à un herbicide, méthodes immunologiques, PCR, LCR, Q β replicase, SNPLex, LAMP, spectroscopie (méthodes pour omics)... au champ et au laboratoire selon ces méthodes (ex: PCR et LAMP au champ)
- Quantification:
 - Méthodes quantitatives
 - Pour les méthodes qualitatives : position envers un seuil avec des méthodes de sous-échantillonnage comme par exemple celles utilisées en certification de semences.
- Identification de la NTMGE utilisée / du propriétaire du produit : recherche de signatures utilisables en approche matricielle avec ou sans DSS et NGS
 - Approche matricielle initiale: profils de mutations et épimutations (toutes techniques)
 - Signatures épigénétiques Crispr
 - Systèmes de structuration moléculaire...
 - Probables signatures univoques...
- Probable capacité à différencier dans plusieurs cas produits issus de mutagenèse *in vitro* et *in vivo*



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...
- 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...

L'identification de la technique initiale et la traçabilité des produits sont possibles...

ECONOMIE DE PROMESSES

**VERS UNE ACCÉLÉRATION DE LA
SÉLECTION?**

NTMGE et sélection variétale

- Les NTMGE: une révolution vraiment ?
- Un plus en sélection variétale?
 - Des applications chez toutes les espèces ?
 - Réduction du temps de criblage, sélection et d'intégration de nouveaux traits ?
 - Nouveaux caractères ? 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...),
 - Une capacité à améliorer la résilience des cultures face au changement climatique? Aux maladies et parasites émergents ?
 - Des produits orientés consommateurs plutôt qu'agriculteurs ?

Les NTMGE: la meilleure façon d'épuiser rapidement les variations utiles en agriculture?

**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...**

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

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

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... fill his prescriptions for a... born without. He... For blood clotting... relies on the local... his medicine. Jimmy... boy that contains his... of patches, removes... from his chest, and... in one. He adjusts his... aids out to meet his... gains of touch football... as in hemophilia. Jimmy... about the bruises and... sure to get.

...scheduled to have her... fully reprogrammed skin... fused to replace her... damaged heart cells... so his Parkinson's... nerve special nerve... are concerned about... capability and rejection... reprogrammed skin... cells.

Patients routinely buy anti-cancer or anti-viral drugs in large quantities to treat their conditions. This is the future. It is what Dolly so wondrously has wrought. Born July 1996, she is the first mammal suc-

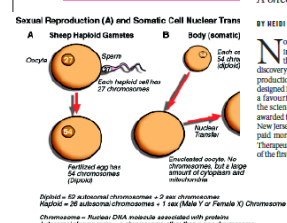
cessfully cloned from an adult cell, one taken from an ewe's mammary gland.

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 cell in a culture dish) are used instead of a sperm. The somatic cells are reprogrammed to become egg cells. One growing oocyte with electric jolts with oocyte from which been previously re-



Oocyte = 27 maternal chromosomes + 2 sex chromosomes
Sperm = 27 paternal chromosomes + 1 sex (Male Y or Female X) Chromosome
Chromosome = Nuclear DNA molecule associated with proteins
Autosomal chromosome = a chromosome other than a sex chromosome

ETATS-UNIS

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

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



Drug giants turn their backs on RNA interference

A once much-touted technique faces a difficult transition to the clinic.

BY REBEKKA LEBRON

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 Regeneron 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 Scripps

A SAMPLING OF RNAI THERAPIES IN CLINICAL TRIALS		Clinical phase	Delivery method
Indication	Company		
Age-related macular degeneration	Quark Pharmaceuticals/ Pfizer/Sentaris Therapeutics	Phase I	Naked RNA
Duchenne muscular dystrophy	Quark Pharmaceuticals/Pfizer	Phase I	Naked RNA
SR	Sumitomo	Phase I	Lipid nanoparticle
Liver cancer	Alnylam/Telexma	Phase I	Lipid nanoparticle
TTR amyloidosis	Alnylam/Sumitomo	Phase I	Lipid nanoparticle
Respiratory syncytial virus	Alnylam/Calber 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 BERLAND, Sénateur.

Entretien avec Yves Chauvin, Prix Nobel de chimie 2005

MENSUEL N° 394 - FÉVRIER 2006



SCIENTIF Avenir

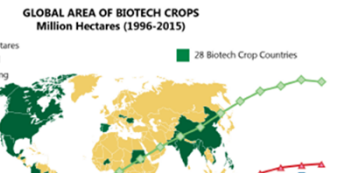
ON A CRÉÉ LE VIRUS LE PLUS DANGEREUX DU MONDE

Pourquoi les chercheurs ont manipulé ce mutant de la grippe H5N1

Recherche L'actualité des sciences

L'avenir du clonage humain

avec le scandale coréen p. 30



The CRISPR Journal

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...

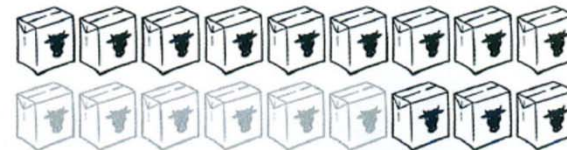
ECONOMIE DE PROMESSES

NOURRIR LE MONDE ?

L'EFFONDREMENT DE LA BIODIVERSITÉ AGRICOLE!

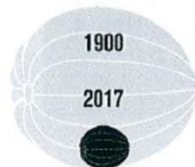
75% des variétés comestibles ont disparu en un peu plus d'un siècle.

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

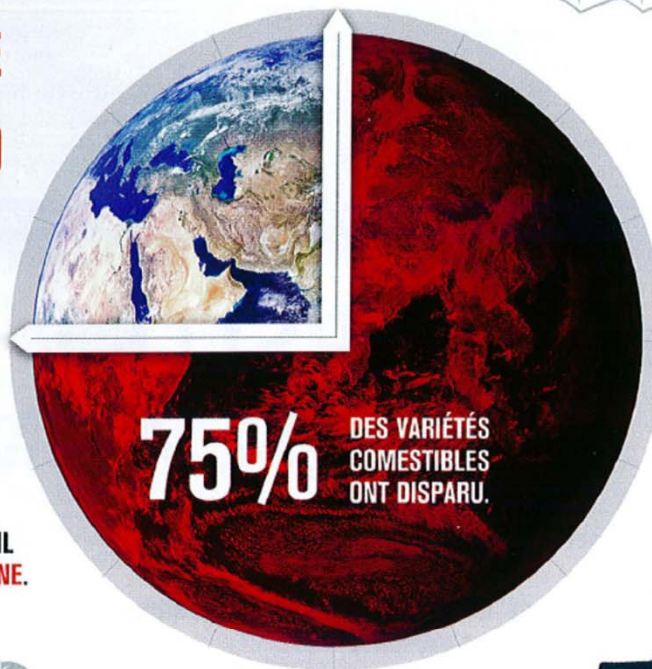


PLUS DE 70%

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**.

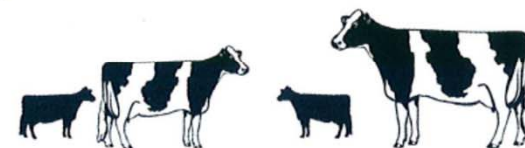


60%

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.

A-t-on vraiment besoin de produire plus dans des espaces agricoles de plus en plus réduits par l'urbanisation galopante ?

Ou de produire mieux ?

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...**

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...

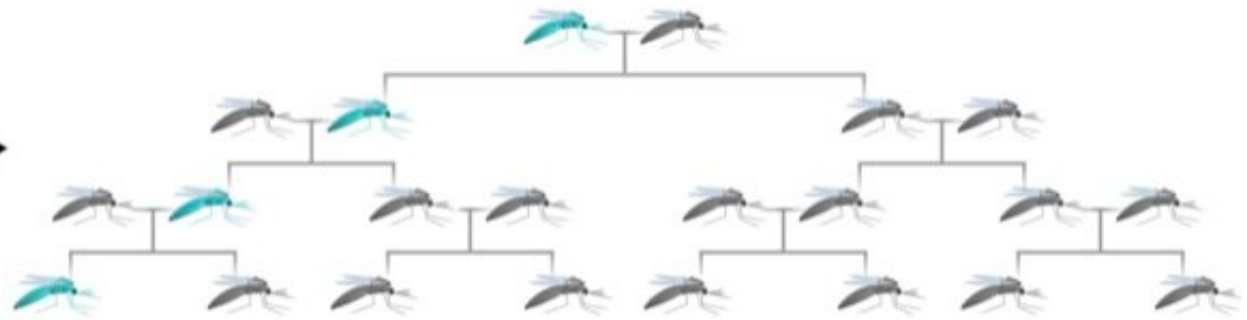
Forçage génétique (« gene drive ») : une nouvelle technique de contrôle des populations déjà dépassée ou une « capture de rente »?

Altered Gene Wild-Type



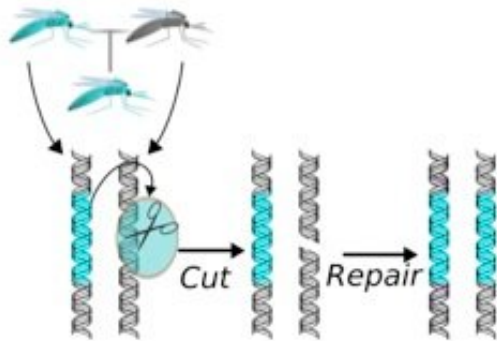
Altered Gene Only
1 copy inherited from 1 parent
50% chance of passing it on

Normal Inheritance



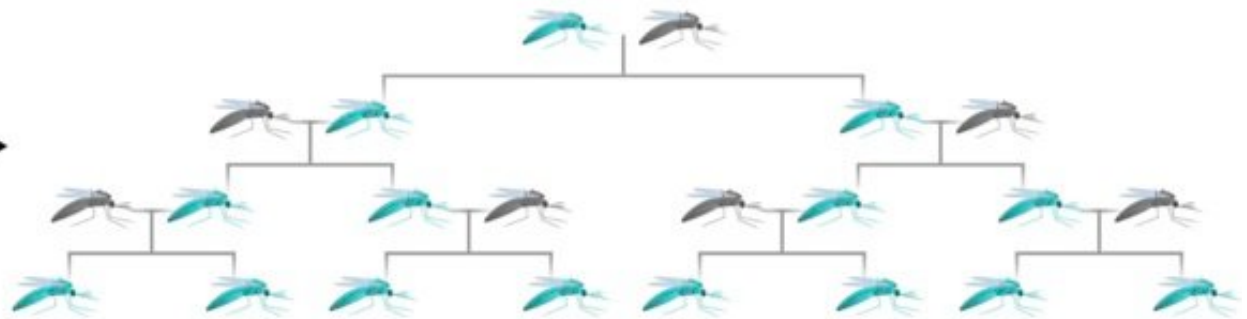
Altered gene does not increase

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* ».

.../...

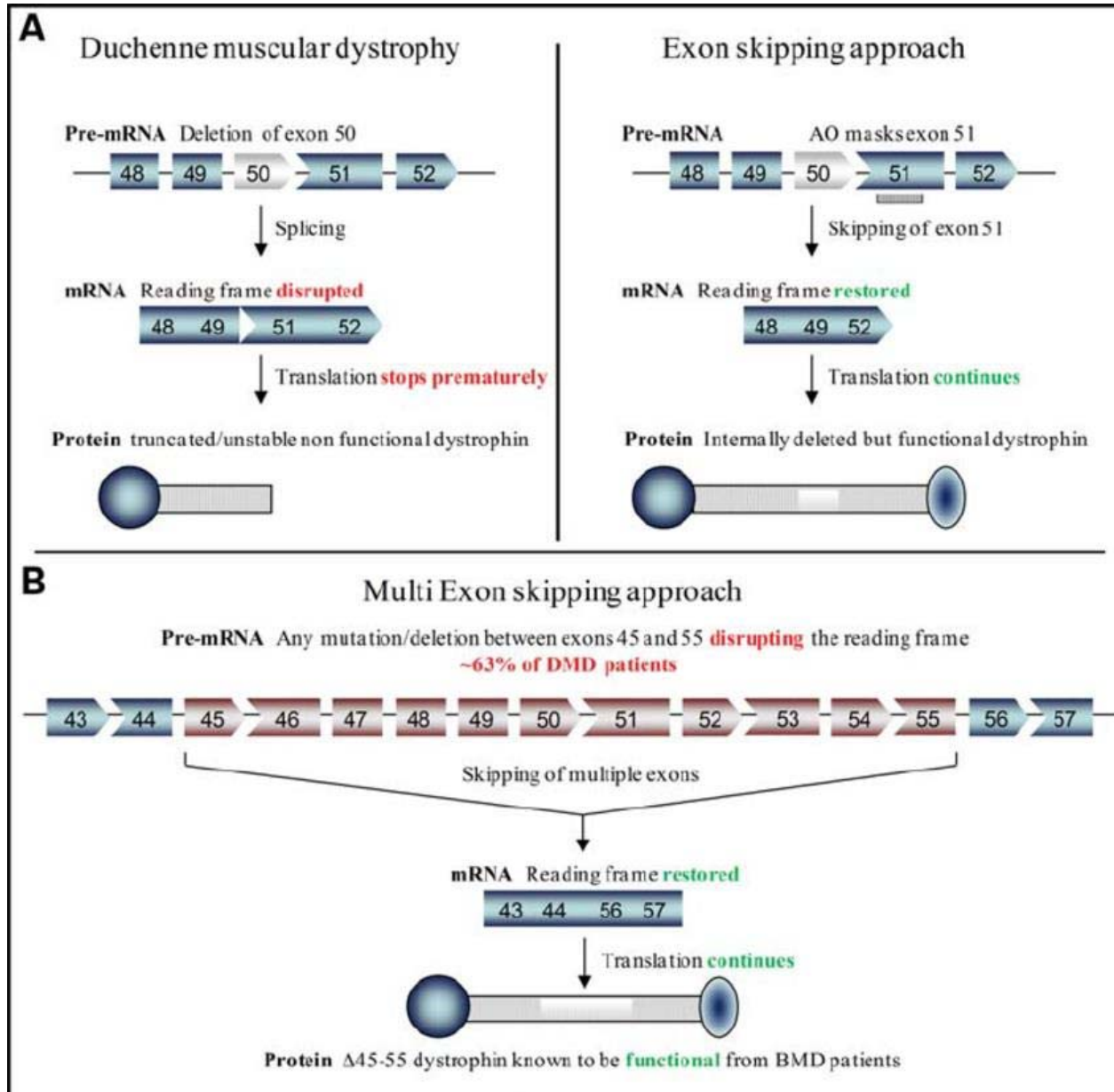
La directrice générale a également mis en garde contre les « *trois désastres au ralenti* » dus à « *la main de l'homme, créés par des politiques qui placent les intérêts économiques au-dessus des préoccupations du bien-être des vies humaines et de la planète sur laquelle ils vivent* » : le changement 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

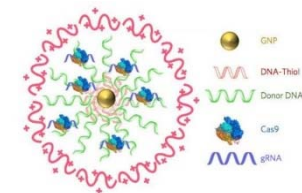
- **Premier cas de résistance** au « gene drive » dès 2017...

Conclusion: une capture de rente...

Economie de promesses, ex : la 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 promesses, ex : la 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...

Cf. <http://www.exonskipping.nl/whats-hot/blog-crispr-technology/>

MÉTAPHORES, COMMUNICATION ET RHÉTORIQUE

Quelques métaphores trompeuses

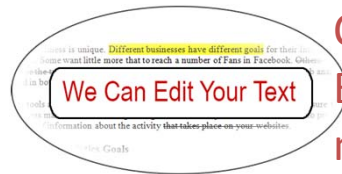
SDN (ciseaux moléculaires):
ne prévoyez pas une coupe
unique et précise



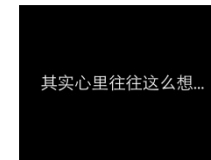
Mais plutôt une série de
découpes (avec de petits
morceaux à rabouter
par un mécanisme de
réparation incontrôlé)



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



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

