



HAL
open science

Détection / identification des techniques NBT et produits dérivés

Yves Bertheau

► **To cite this version:**

Yves Bertheau. Détection / identification des techniques NBT et produits dérivés. Formation des membres de la Réunion semences et NBT - Bagnolet- 7 mars 2018 (Détection / identification des techniques NBT et produits dérivés), 2018. hal-02791514

HAL Id: hal-02791514

<https://hal.inrae.fr/hal-02791514>

Submitted on 5 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.

Détection / identification des techniques NBT et produits dérivés

Yves Bertheau

Inra – MNHN

7 mars 2018

Réunion semences et NBT



Approche matricielle: principe

(agréger un faisceau convergent de preuves)

<http://www.inra.fr/Entreprises-Monde-agricole/Resultats-innovation-transfert/Toutes-les-actualites/Detecter-les-OGM-inconnus>

Exemples dans d'autres domaines de l'identification

Prémises classiques de l'identification

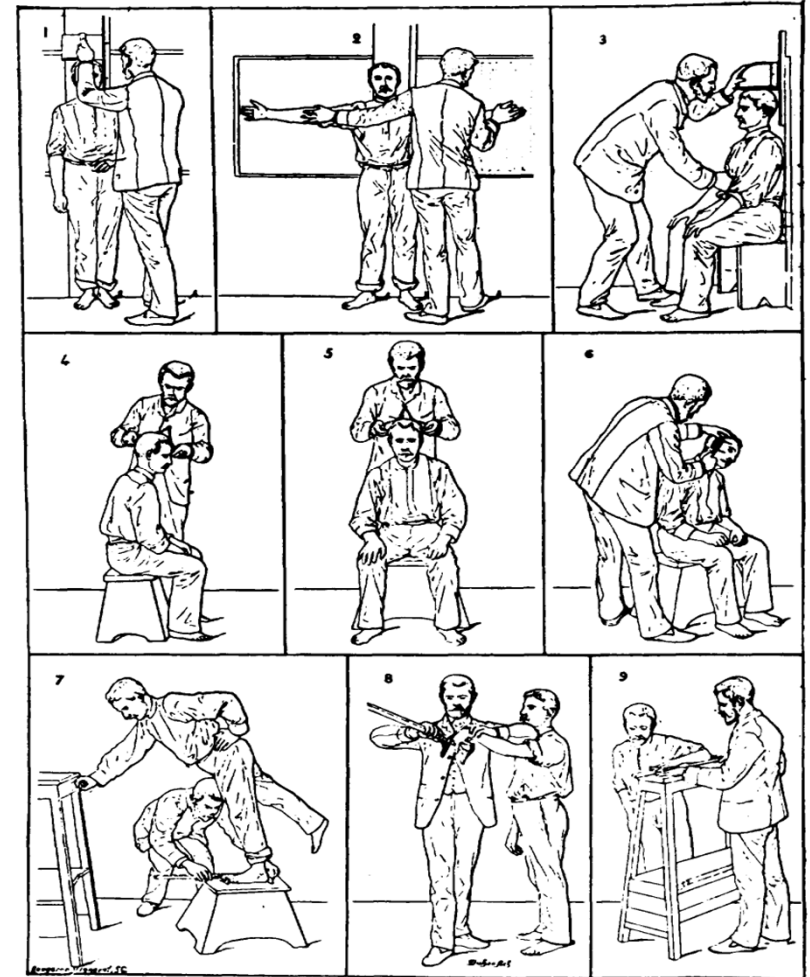
- Principe:
 - Observer / distinguer des caractères, traits... ex: forme des fleurs, des animaux, poils ou plumes...
 - Inventorier les éléments: appareils de locomotion, os, disposition, ontogénèse...
 - Classifier les éléments: phénotypiques, génotypiques, épigénotypiques, épitranscriptomiques...
 - Analyser, séquences acides nucléiques; protéines, comparer ADN / protéines (sauts d'exon, épissages alternatifs)...
 - Combiner les éléments si nécessaires selon le degré de précision désiré,
 - Corréler, par exemple dans des arbres (arborescence évolutive...)
- Utilisateurs: Aristote, Linné, Jussieu, Darwin... sélectionneurs des firmes semencières...

L'identification des techniques NBT et des produits issus n'est qu'une application des méthodes et cibles utilisées en taxinomie, phylogénie / cladistique / phénétique / statistiques, identification variétale, sélection assistée par marqueurs, détection des OGM... assistée ou non par divers outils statistiques, bases de données, systèmes d'aide à la décision (DSS)...

Autres exemples de l'approche matricielle

Principes de base
de l'identification
scientifique comme
synthétisé par
Alphonse Bertillon
en anthropométrie
judiciaire

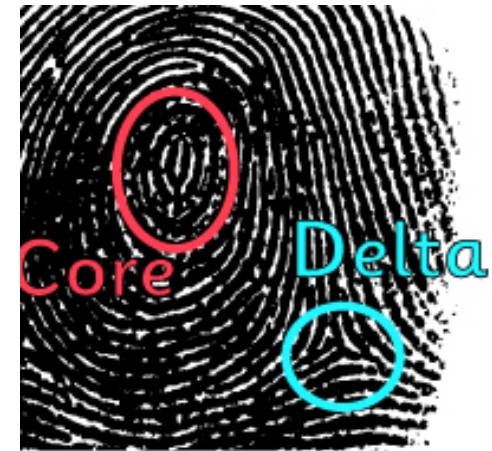
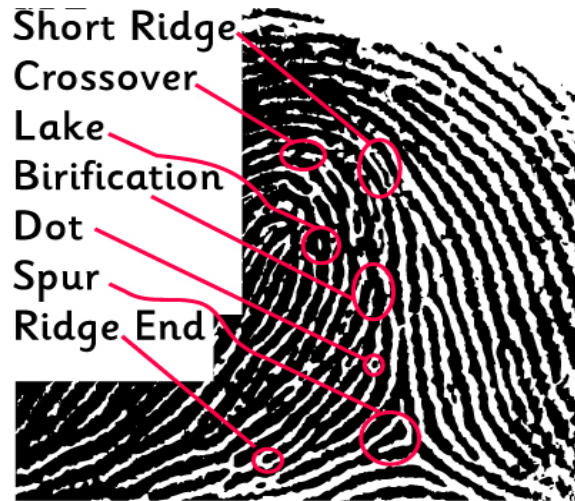
RELEVÉ DU SIGNALEMENT ANTHROPOMÉTRIQUE



1. Taille. — 2. Envergure. — 3. Buste. —
4. Longueur de la tête. — 5. Largeur de la tête. — 6. Oreille droite. —
7. Pied gauche. — 8. Médius gauche. — 9. Coudée gauche.

Autres exemples de l'approche matricielle

Quelques caractères / traits de différenciation en dactyloscopie



Autres exemples de l'approche matricielle

Principes généraux de dactyloscopie



Fingerprint Principles

According to criminal investigators, fingerprints follow 3 fundamental principles:

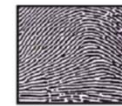
- ▶ A fingerprint is an **individual** characteristic; no two people have been found with the **exact** same fingerprint pattern.
- ▶ A fingerprint **pattern** will remain **unchanged** for the **life** of an individual; however, the print itself may change due to permanent scars and diseases.
- ▶ Fingerprints have general characteristic **ridge** patterns that allow them to be systematically identified.

Fingerprint Classes

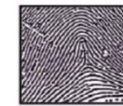
Fingerprints can be classified into three different groups based on the pattern of the ridges.

Arches

Ridges enter on one side & exit on the other side.



Plain Arch



Tented Arch

Loops

Ridges enter on one side & exit on the same side



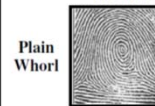
L - Radial Loop
R - Ulnar Loop



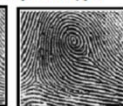
L - Ulnar Loop
R - Radial Loop

Whorls

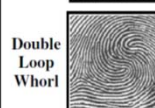
Consists of circles, more than one loop, or a mixture of pattern types



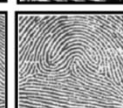
Plain Whorl



Central Pocket Whorl



Double Loop Whorl

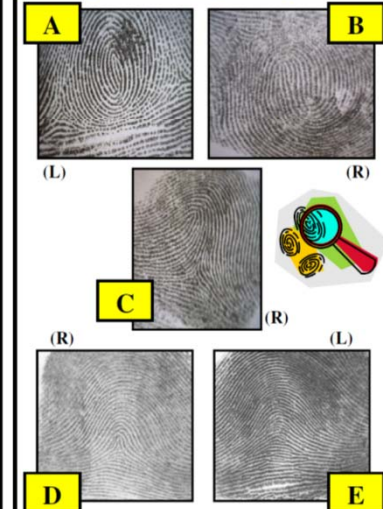


Accidental Whorl

Did you know?

Dactyloscopy is the study of fingerprint identification. Police investigators are experts in collecting "dactylograms", otherwise known as fingerprints.

Can you identify each pattern?

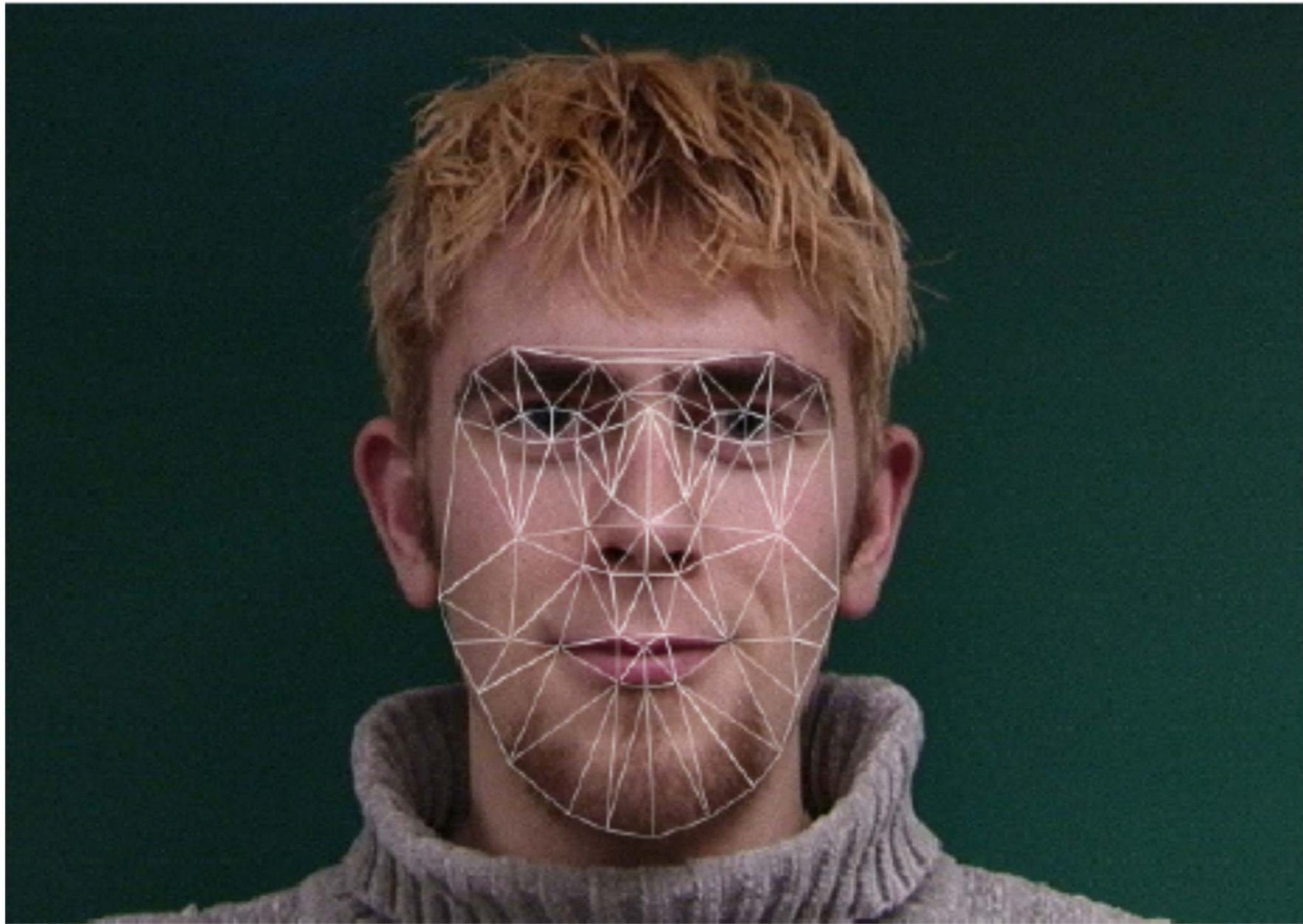


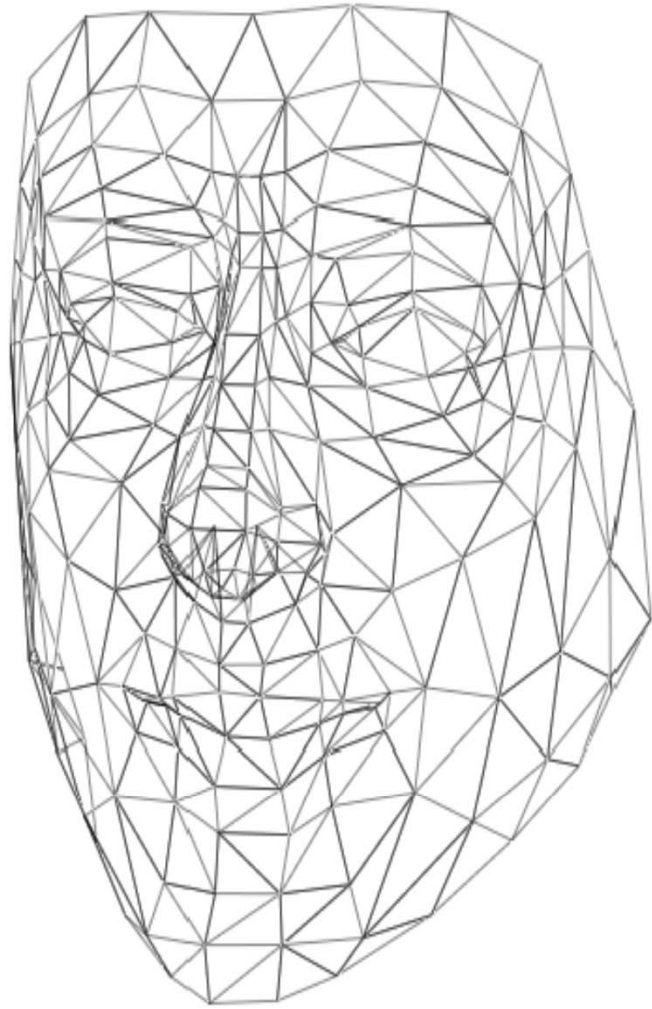
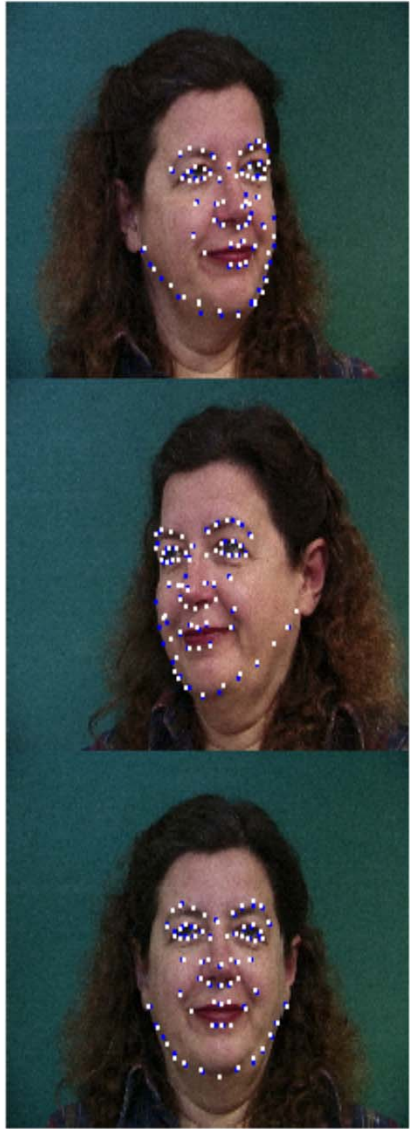
Fingerprint Factoid

Approximately 60% of people have loops, 35% have whorls, and 5% have arches.

Autres exemples de l'approche matricielle

Reconnaissance faciale
multipoints

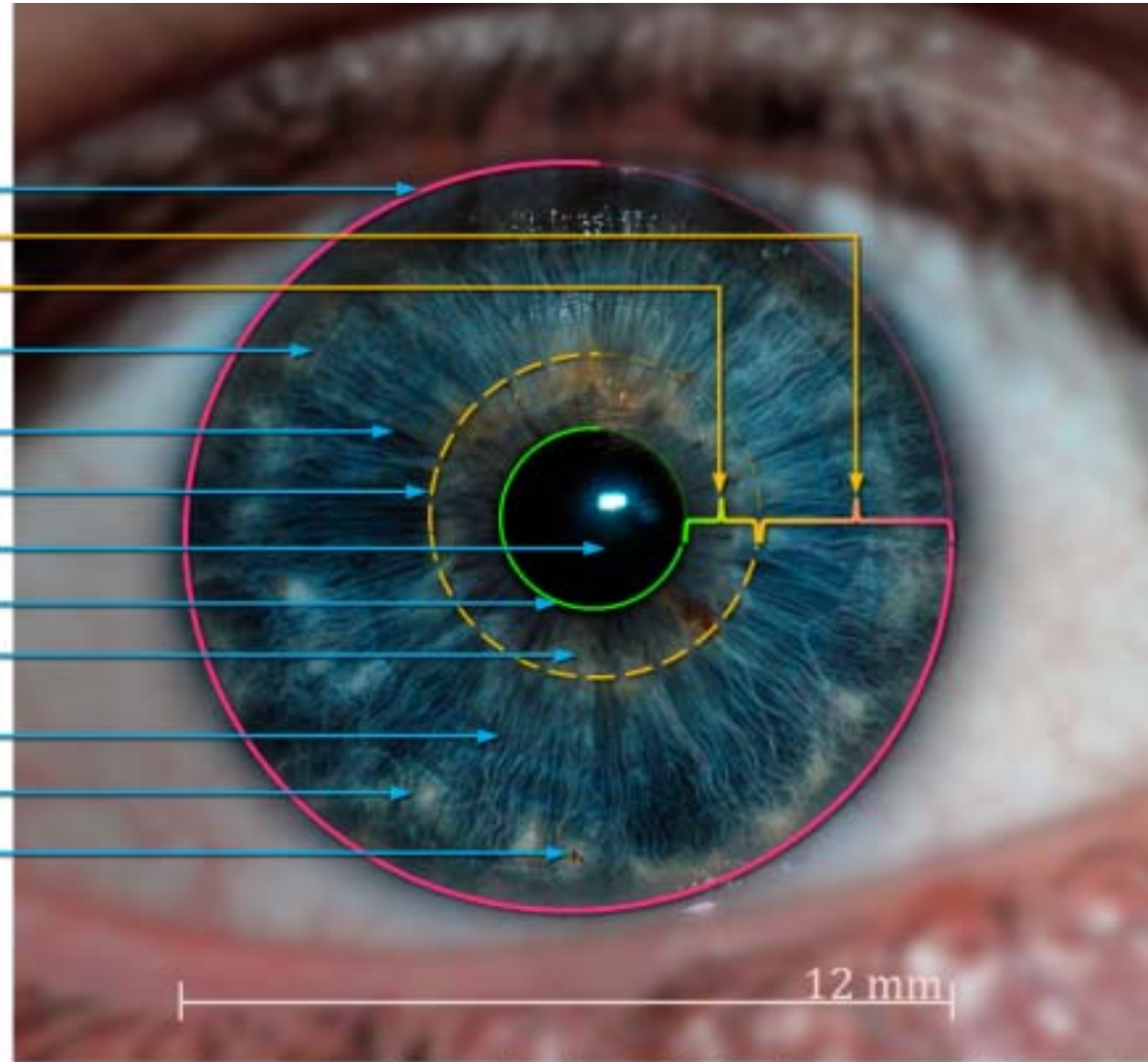




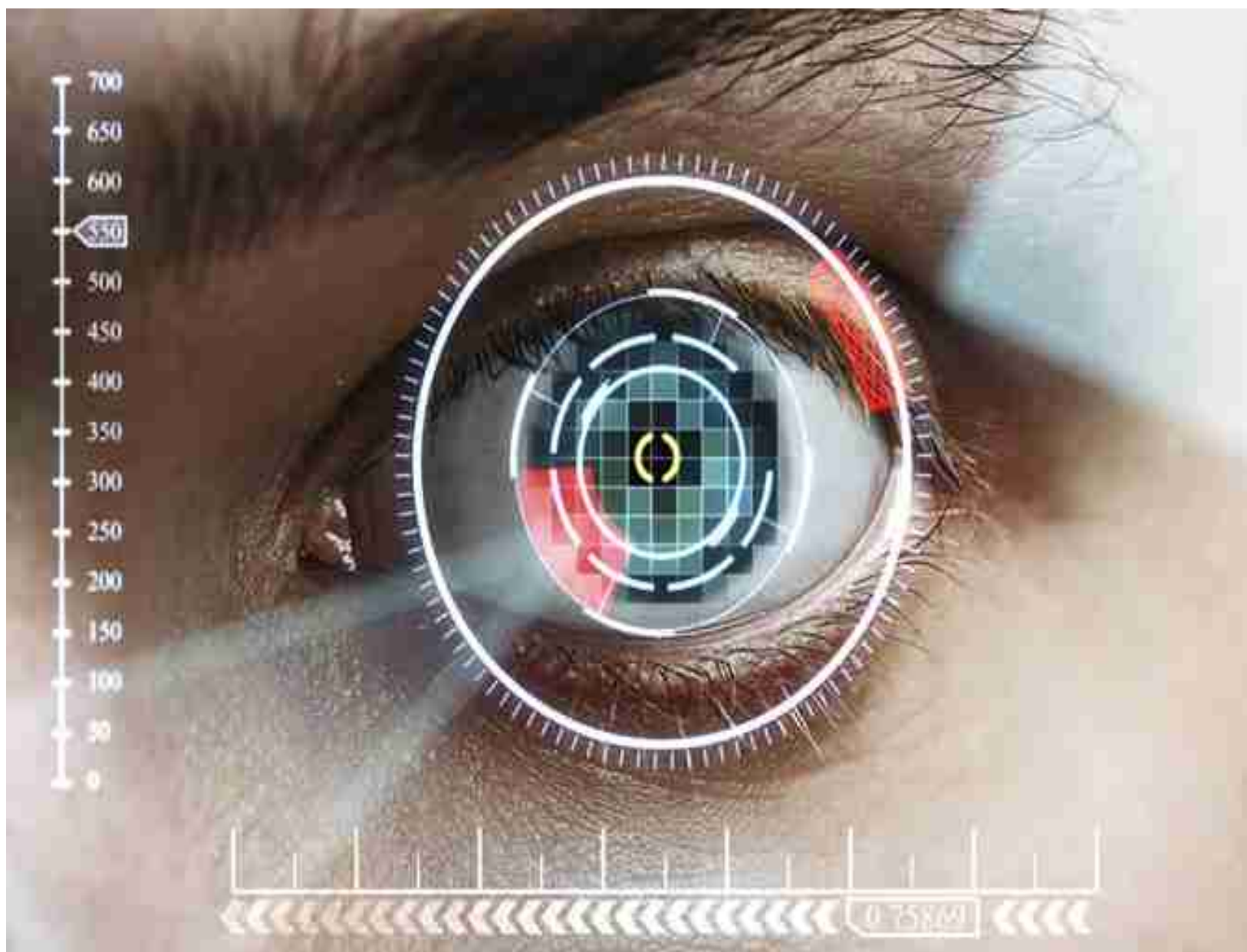
Autres exemples de l'approche matricielle

Reconnaissance de l'iris

- Limbus boundary
- Ciliary zone
- Pupillary zone
- Contractile furrows
- Crypt
- Collarette
- Pupil
- Pupillary boundary
- Pupillary frill
- Stroma fibers
- Wolffin nodules
- Nevi



Source (eye image): Dr. Jan Drewes. www.jandrewes.de





Polymorphisme génétique

DNA Fingerprinting

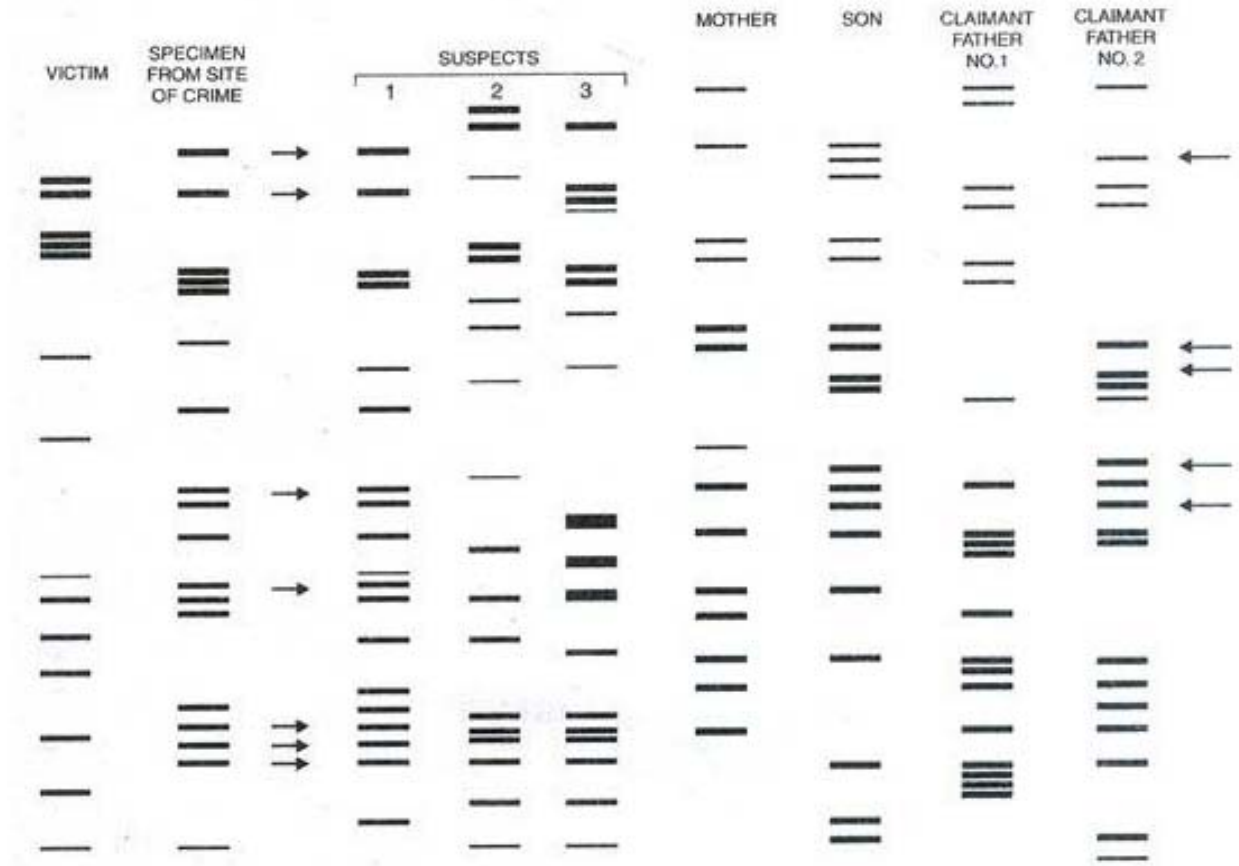
Comment devenir un des experts de la police technique et scientifique,
ou - plus prosaïquement - identifier des variétés
pour faire de la sélection assistée par marqueurs...

« En plus, le génome des plantes présente une extrême diversité, souligne Jeffrey Sander, chercheur au département d'ingénierie moléculaire de Pioneer (Johnston, Iowa)

Entre deux variétés de maïs, il y a la même distance génétique qu'entre un homme et un singe. »

Autres exemples de l'approche matricielle

Selon les contextes, le « poids de l'évidence » (ici le nombre de bandes d'identification différenciant les individus dans ces études médico-légales) peut différer...



Identification of a criminal through DNA finger printing. Suspect number one is real culprit, as its VNTR bands are matching with specimen from site of crime.

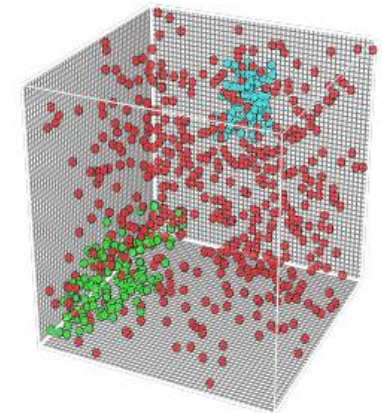
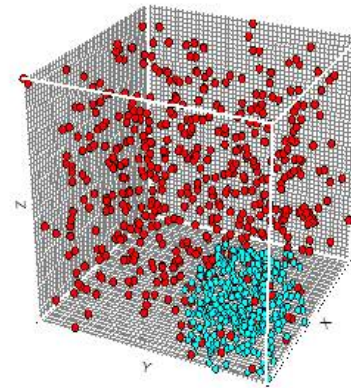
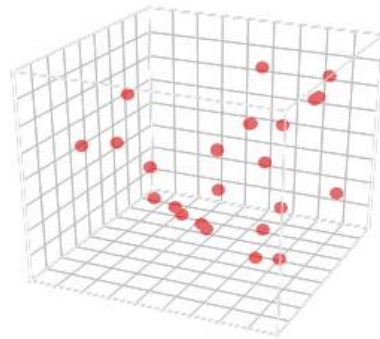
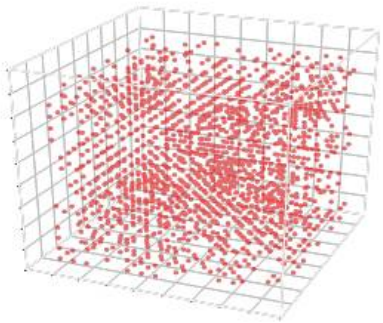
DNA fingerprints of mother under consideration, the child and two claimant fathers. Claimant father No. 2 proved to be the real/biological father.

Autres exemples de l'approche matricielle

Autre approche de la reconnaissance faciale en contexte bruité : similarités d'approche entre séquençage de génomes et/ou épigénomes et méthodes de reconnaissance par scanning (ex: méthode Viola-Jones)



L'approche matricielle pour identifier les techniques NBT utilisées et les produits dérivés revient à choisir des assemblages de marqueurs de différents types, par exemple dans les génomes et épigénomes



Marqueurs en tout genre des génomes et épigénomes (ex: utilisés pour une SAM, PAM, off-targets, translocation, transversion... fréquence, cartographie...)

Choix de marqueurs d'identification de l'espèce

Choix de marqueurs différenciant les produits issus de techniques in vitro

Choix de marqueurs différenciant une (des) technique(s), ex. Crispr-endonucléase(s) de mutation(s) naturelle(s)

- Choix d'une combinaison pour les identifications univoques légales
- Choix d'un (ou de quelques) marqueur pertinent (ex: PCR sur mutation ciblée-PAM) pour les détections de routine (aspects de coût, rapidité...)

Conclusion

- Ne pas se laisser abuser par l'arbre qui cache la forêt :



- Un élément, seul, isolé, peut ne pas constituer une signature univoque (mais un fragment de bordure ou un réarrangement interne à un insert suffit pour les OGM de transgénèse...), c'est ce qu'on vous demande généralement de considérer pour les NBT (pour vous faire admettre que la modification est naturelle), pas l'ensemble...
- Divers éléments rassemblés (cf. ci-dessous pour les NBT et les mutagénèses *in vitro* vs. *in vivo*) permettent de déterminer la technique employée puis de tracer le produit en n'employant qu'une partie des éléments (aspect coûts, rapidité... selon les besoins des analystes)
- Ces pratiques d'approche matricielle sont déjà en cours (détection d'OGM connus et inconnus, pour réduire les coûts, simplifier des détectations sur échantillons complexes...) et facilitées par les bases de données des laboratoires et les DSS...

Méthodes de détection

Méthodes disponibles

- Phénotypiques (ex: tolérance à un herbicide, immunologie...)
- Omics (modification métabolomique, protéomique...)
- Moléculaires : génomes et épigénomes / épitranscriptomes (ADN, protéines, ARN):
 - ADN, ARN et protéines modifiés ou non
 - Simplex (PCR, LCR, OLA...) à multiplex (SNPLex, puces à ADN...),
 - Du nucléotide (LCR, OLA...) au grand réarrangement chromosomique (fragment de bordure...),
 - Isotherme ou non (LAMP, NASBA...)
 - Combinées ou non (ex: SNPLex = LCR + PCR + puce à ADN)
 - Séquençage (Sanger, NGS; ChiSeq, ARNSeq...) avec ou sans génome de référence,
 - Sur tissus ou cellules isolées, noyau ou organites,
 - Au laboratoire ou au champ (PCR, LAMP, séquençage...)
- En utilisant des cicatrices et signatures
 - Univoque(s) ou multiple(s) (bases de données et DSS, cf. travaux réseau ENGL et programme FP6 Co-Extra)
 - Analysables avec divers logiciels (assemblages, comparaisons, phylogénie, statistiques, cartographies)
 - Combinables et modulables selon les besoins: identification légale vs. détection de routine



Cibles

In vitro versus *in vivo*

- Rien n'interdit de s'intéresser aux modifications des génomes des organites (mitochondries...) en sus du noyau (cf. stress post-traumatique guerre du Golf...)
- Un fondamental:
 - les génomes et épigénomes sont stables (en équilibre comme résultat de l'évolution), cf. travaux sur la stabilité des génomes animaux et végétaux comme le « Chêne Napoléon », la tomate...
 - ne subsistent que les modifications neutres ou sous pression de sélection qui sont transmissibles...
- Méthodes de mutagénèse aléatoire : chimique, physique
 - Types de modifications induites, ex: transversion, micro-délétions selon mutagène (EMS, ENU, flux de neutrons, rayons γ ...)
 - Caractérisations (principe et logiciels des tilling / ecotilling, NGS...) : fréquences / statistiques, cartographies, hotspots...
- Techniques connexes : « cicatrices » (dont variations somaclonales suite électroporations, cultures cellulaires, régénération des calls / plantes...),...
 - Mutations et épimutations au hasard des ADN, protéines et ARN (le changement d'un nucléotide peut induire mutations et épimutations, positionnement dans les TAD et expression de gène...)
 - Modification de polymorphismes: cartes génétiques, SNP, profils de séquences répétées STR, microsat...
 - Mouvements d'éléments transposables, études de hotspots et coldspots de recombinaison,
 - Traces d'éliminations de séquences de sélection des cellules modifiées (ex: Cre-Lox),

Signatures générales

- Comparaison de descendance cellulaire (« cell lineage », cf. par exemple <https://www.pourlascience.fr/sd/genetique/suivre-le-devenir-de-chaque-cellule-du-corps-9810.php>) a niveau des génomes et épigénomes nucléaires et des mitochondries

Signatures NBT

- Proximité PAM (quelquefois plusieurs) et mutation(s) / épimutation(s) ciblée(s), ex: Crispr-endonucléase,
- Off-targets proximité PAM, off-targets de RNAi, ZFN et TALEN,...
- Insertions de restes de vecteurs (ex: génome et plasmide d'*Agrobacterium*) pour SDN, RNAi...
- ADN contaminant pour les systèmes RNP (cf. résultats d'insertion d'ADN dans le génome humain...), modifications de la chromatine,
- « barcode » naturel ou basé sur Crispr d'enregistrement des modifications des génomes et épigénomes et signaux environnementaux...
- ADN, ARN (dont ARNm) et protéines circulant entre porte-greffe et scion,

Conclusion

- L'identification des méthodes mises en œuvre (in vitro vs in vivo, NBT...) est possible en utilisant l'approche matricielle déjà utilisée pour les OGM connus et inconnus, comme dans d'autres domaines de l'identification / détection...
- Les techniques et cibles mises en œuvre sont du même type que celles utilisées par les semenciers pour l'identification variétale, la SAM...
- Une, ou partie, de ces cibles peut suffire en routine, donc au moindre coût comme pour les OGM actuels
- La preuve de concept sera accessible
 - Dès que les programmes de recherche proposés par ENGL à la Commission européenne en 2013 seront lancés,
 - Les matériaux de référence seront fournis par les firmes comme pour les OGM de transgénèse (règlements 1829/03 et 1830/03)
- Les prémisses n'ayant pas été remplies dans les rapports HCB, Scientific Advice Mechanism européen... malgré le temps disponible (5 ans au HCB...) et les moyens considérables (40 experts au HCB), en absence d'élicitation des experts (ex: Q method) et de consultation du public démontrent un choix politique (cf. discours JY Le Déaut à l'OPECST en 2016, commentaire Commissaire européen janvier 2018...) permis par l'utilisation d'un raisonnement circulaire (un classique des biais scientifiques)...