



# CRISPR-Cas9 chez les végétaux : état de l'art, applications potentielles et cadre réglementaire

Peter ROGOWSKY

UMR Reproduction et Développement des Plantes, Lyon

10 novembre 2016



*Pour toute utilisation du contenu de cette présentation, veuillez citer l'auteur, son organisme d'appartenance, le volet 4 des ateliers « Modifications ciblées des génomes et enjeux éthiques » de la Plateforme « Génétique et Société » de Toulouse, le titre du document ainsi que la date. Merci*





# I. CRISPR-Cas9 – comment cela marche?

# CRISPR/Cas9 et l'édition des gènes – une révolution?

- CRISPR/Cas9

- une nucléase ciblée ("site directed nuclease" ou SDN) parmi d'autres (zinc finger, méganucléase, TALEN)
- plus facile à mettre en œuvre que les autres SDN
- permet de toucher plusieurs gènes à la fois
- à la portée de la majorité des laboratoires de biologie végétale

- L'édition des gènes *sensu strictu* (remplacement de 1 ou plusieurs nucléotides)

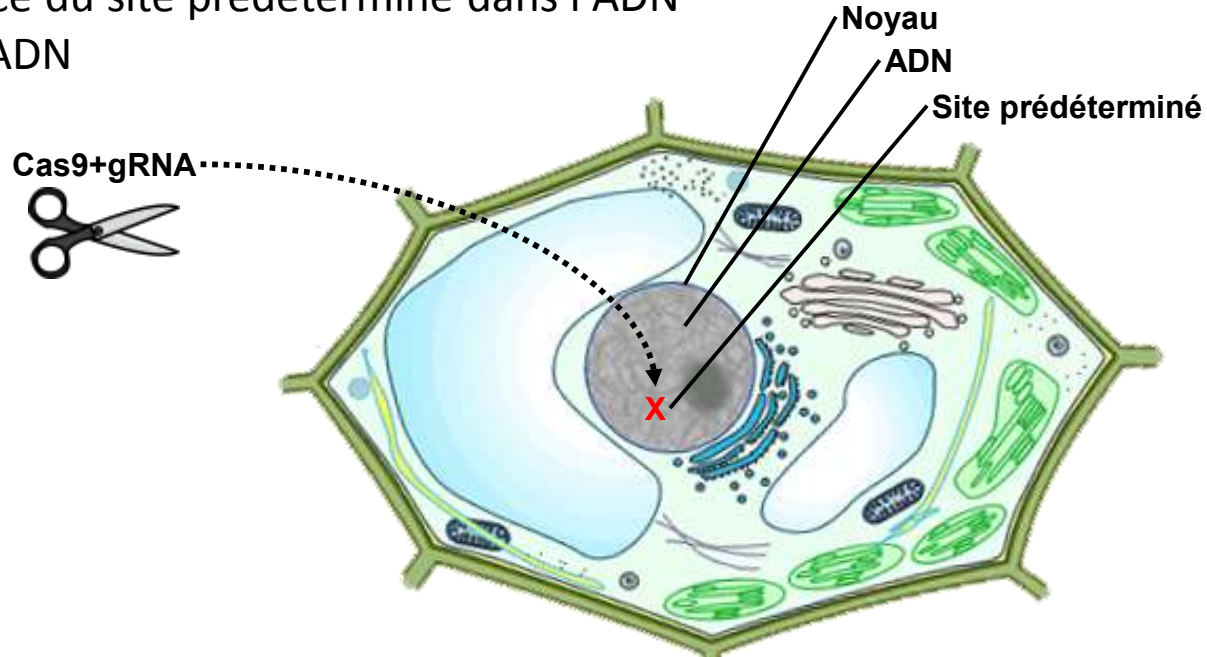
- monnaie courante chez des microorganismes (bactéries, levure) depuis des décennies
- récent chez les végétaux



👉 CRISPR-Cas9 rend l'édition des gènes de végétaux accessible à des milliers de laboratoires

# Mécanisme CRISPR/Cas9: (i) la coupure de l'ADN

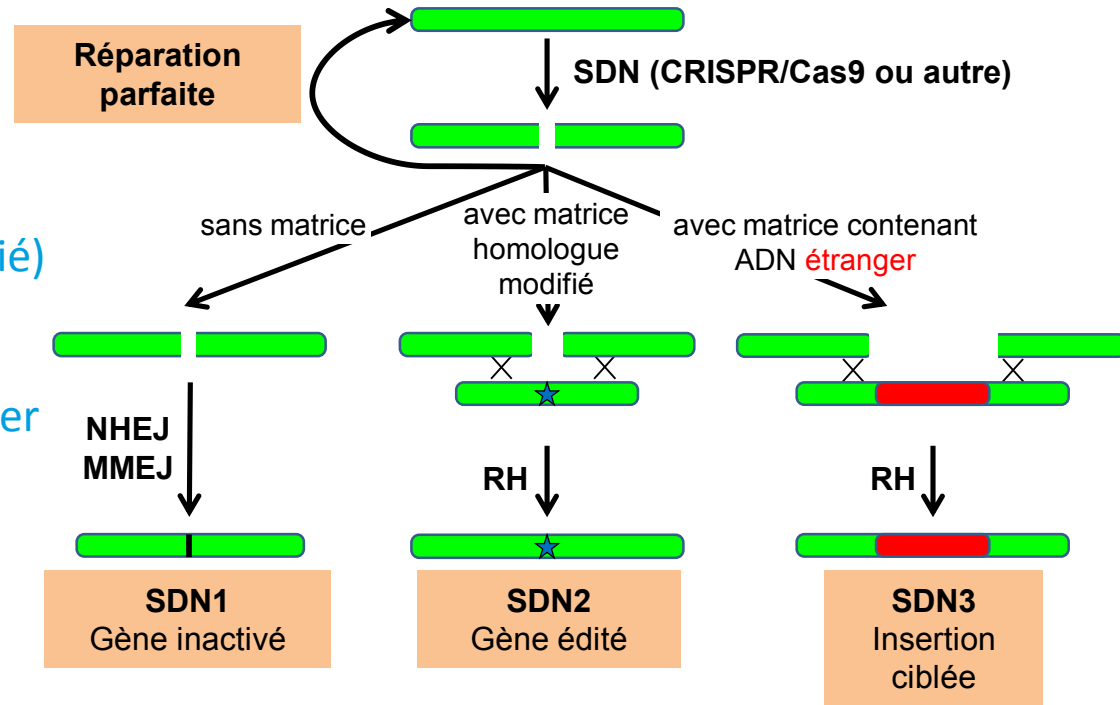
- Design et production de CRISPR-Cas9
- Introduction de CRISPR-Cas9 dans la cellule végétale et le noyau
- Reconnaissance du site prédéterminé dans l'ADN
- Coupure de l'ADN



👉 CRISPR-Cas9 permet de couper le génome à un site unique et prédéterminé

# Mécanisme CRISPR-Cas9: (ii) la réparation de la cassure

- Réparation parfaite
- SDN1 (sans matrice)
  - Inactivation de gène
- SDN2 (en présence d'un gène modifié)
  - Edition de gène à une ou plusieurs positions
- SDN3 (en présence d'un ADN étranger entre extrémités homologues)
  - Insertion ciblée d'un transgène dans le génome



☞ La modification de l'ADN se fait lors de la réparation de la cassure par la cellule végétale

# Evolution de la technologie CRISPR-Cas9

- Remplacement de la Cas9 par d'autres protéines
  - CPF1
  - reconnaissance ADN/ADN plutôt que ARN/ADN
- Perfectionnement de l'introduction dans la cellule
  - sous forme d'ARN ou protéine
- Autres fonctions que nucléase (deadCas9)
  - marquage fluorescent de sites
  - modifications épigénétiques ciblées (méthylation, chromatine)
  - modifications ciblées des sites de recombinaison

 Effervescence d'innovation autour de CRISPR-Cas9

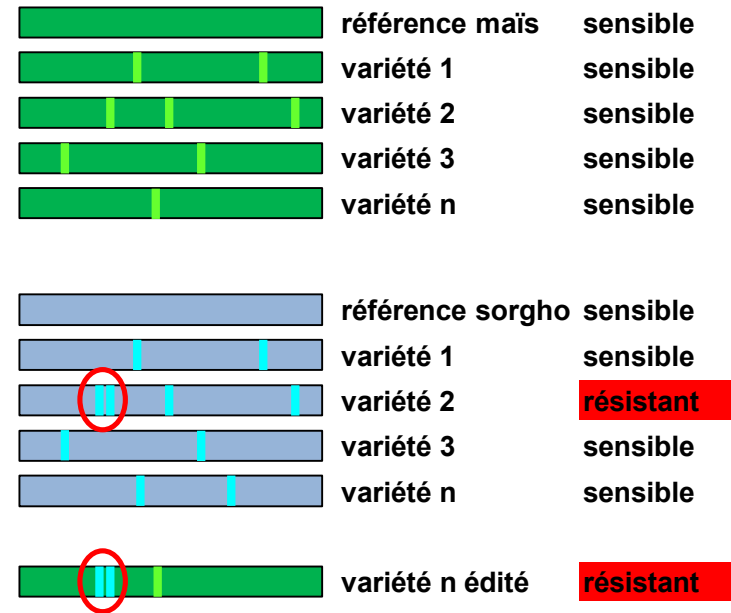
# CRISPR-Cas9: élargissement réfléchi de la base génétique

- **Situation hypothétique**

- Absence de gène de résistance contre un pathogène dans la variabilité naturelle du maïs
- Connaissance d'un gène de résistance chez le sorgho
- Connaissance des bases importantes
- Présence du gène maïs pas de la forme résistante chez le maïs

- **CRISPR-Cas9**

- Maïs devient résistant grâce à l'édition de 2 bases



☞ CRISPR-Cas9 fournit des allèles absents dans la variabilité naturelle de l'espèce

# CRISPR-Cas9 – limitations et promesses

- Pré-requis pour la mise en œuvre
  - Connaissances préalables
    - quel(s) gène(s) éditer pour obtenir un trait agronomique donné?
    - quelle(s) modification(s) apporter à ce(s) gène(s)?
  - Maîtrise de l'ingénierie cellulaire
    - dans l'espèce et le génotype d'intérêt
    - idéalement sans introduction d'ADN dans le génome
- Intérêt de la technique
  - Outil très puissant en recherche pour la connaissance
    - modification ciblée de gènes, observation des propriétés des plantes obtenues, conclusions sur la fonction des gènes
  - Obtention de plantes avec de nouvelles caractéristiques
    - obtention d'allèles (variantes) de gènes absents dans la variabilité naturelle, essentiels pour un trait d'intérêt

 CRISPR-Cas9 nécessite connaissances et technicité, élargit la base génétique





## II. CRISPR-Cas9 – applications en agriculture

# SDN1 (inactivation) – preuves de concept

- **Résistance** au mildiou chez le blé
- **Résistance** au TYLCV chez le tabac
- **Résistance** à 3 potyvirus chez le concombre
- **Nanisme** chez l'orge
- **Huile** plus riche en acide oléique chez le soja
- **Amidon** sans amylose chez le maïs Waxy
- . . . . autres . . .
- **Projet GENIUS**
  - modification de l'amidon chez la pomme de terre
  - gamètes diploïdes chez le maïs
  - architecture de la racine chez le riz

nature  
biotechnology

Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew

Molecular Plant Pathology

MOLECULAR PLANT PATHOLOGY

DOI: 10.1111/MP.12375

Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology

RESEARCH

Open Access

CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants

RESEARCH

Open Access

Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease

Plant Biotechnology Journal

aab SEB

New Biotechnology Journal (2014), pp. 1–7

doi: 10.1111/PLB.12371

Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family

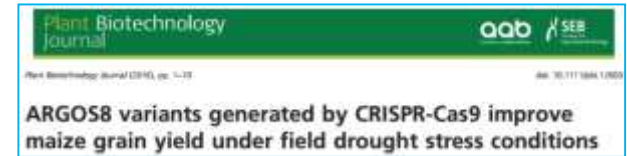
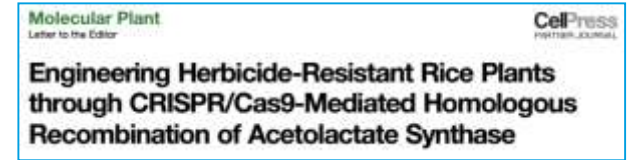
**CRISPR-edited crops free to enter market, skip regulation**

DuPont Pioneer's high amylopectin corn is the first CRISPR-edited plant likely to bypass USDA oversight.

☞ L'inactivation ciblée des gènes est aujourd'hui maîtrisée chez de nombreuses espèces

# SDN2 (édition de gènes) – preuves de concept

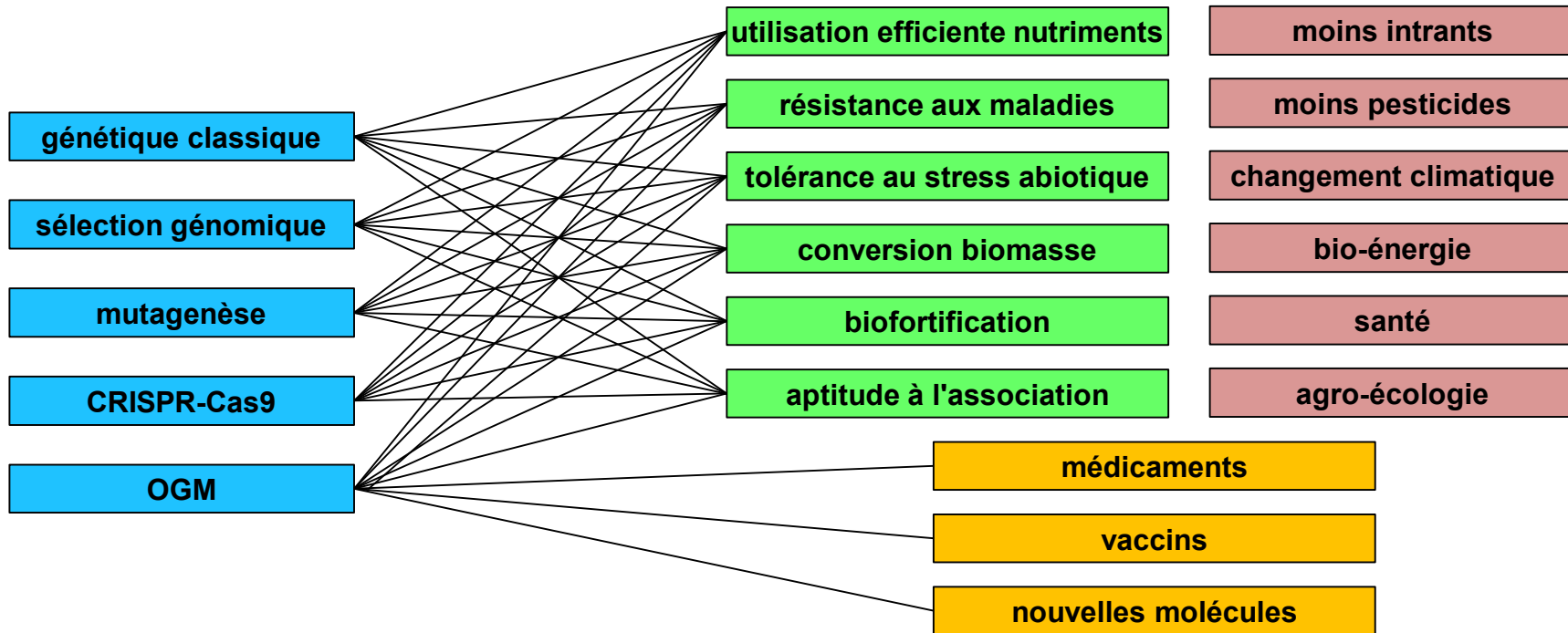
- **Résistance à l'herbicide BS (bispyribac sodium)** chez le riz et autres espèces
- **Rendement maïs sous contrainte hydrique**
- **Projet GENIUS**
  - résistance au potyvirus chez la tomate
  - tolérance à la salinité chez le riz



👉 L'édition des gènes *sensu strictu* reste actuellement techniquement délicate

# CRISPR-Cas9 – quels traits?

- Absence de lien entre technique et trait agronomique (sauf OGM)



👉 CRISPR-Cas9 peut être utilisés pour une large gamme de traits

# Remarques pour une discussion sereine

- CRISPR-Cas9 – une révolution qui fait des miracles tout seul?
  - Autres leviers pour relever les défis de l'agriculture
    - sociétal (habitudes alimentaires, gaspillage)
    - économique (accès à la surproduction)
    - agronomique (labour, traitements, rotation)
    - génétique (semences paysannes, génétique classique, sélection génomique)
  - Utilisation des plantes issues de CRISPR-Cas9 dans des systèmes de culture adaptés
- CRISPR-Cas9 – des amalgames fréquents
  - Système de culture
    - monoculture tout comme rotation tout comme association intra- et inter-espèces
    - agriculture intensive tout comme extensive (AB)
  - Acteurs socio-économiques
    - multinationales tout comme petits et moyens entreprises (CIBUS, Calyxt etc)
  - "OGM"
    - statut reste à clarifier
  - Modèle de l'agriculture
    - agriculture industrielle tout comme exploitations à taille humaine

👉 Acceptation de la technique ≠ acceptation d'un type d'agriculture



### III. CRISPR-Cas9 – le dilemme du législateur

# La situation actuelle

- Des plantes ayant perdu un gène sont soumis à des traitements réglementaires différents, si obtenus par:
  - mutation naturelle pas de réglementation
  - insertion transposon endogène pas de réglementation
  - irradiation OGM dérégulé
  - mutagenèse chimique OGM dérégulé
  - insertion d'un transgène (ADN-T) OGM
  - forçage génétique CRISPR/Cas9 ???
  - action de CRISPR/Cas9 ???
- Questions ouvertes
  - Evaluation du processus ou du produit?
  - Adéquation du cadre réglementaire existant?

**The Arabidopsis thaliana PsbS mutant**  
The same mutant produced five times, but which ones are within the scope of the European GMO legislation?

**What is the function of PsbS?**  
PsbS is a protein which is involved in photosynthesis light harvesting and has been characterized as a "safety valve". Plants that lack the protein show reduced fitness and seed production under natural conditions. Mutant plants that fully lack the protein or produce a dysfunctional protein have been obtained in different ways.

**A The radiation mutant**  
The first PsbS mutant was made by exposing Arabidopsis plants to fast neutrons. The fast neutrons generate changes in the DNA. One is repaired by the cell's own DNA repair machinery. During this repair, the whole PsbS gene was deleted and PsbS is therefore not present in the plant. However changes in other genes may also have occurred following the radiation.

**B The chemically induced mutant**  
The second PsbS mutant was made by exposing Arabidopsis plants to the chemical mutagen EMS. One letter in the gene for PsbS was changed leading to a dysfunctional PsbS protein.

**C The T-DNA mutant**  
The third PsbS mutant was made by transferring 10-cpbkd T-DNA from the soil. It is more sophisticated technology to Arabidopsis plants. The T-DNA has interrupted the PsbS gene leading to a disruption of the gene. The result is that the PsbS gene is no longer functional.

**D + E The modern genome edited mutant**  
A short piece of technology to generate PsbS mutants is the so-called CRISPR/Cas9 genome editing. This CRISPR/Cas9 system generates two opposite strand breaks close to each other at predetermined locations in the PsbS gene. The subsequent mechanism repairs the break, joining the DNA between the breaks leading to a dysfunctional PsbS gene. The recombinant mutant that still contains the CRISPR/Cas9 system that generates the double strand breaks is called mutant D. The final mutant E is produced from mutant D after removal of genome editing. The genome editing no longer controls the genes for the complex and they are selected constant E. They contain no foreign DNA and are only other than wild type Arabidopsis in a small deletion in the PsbS gene.

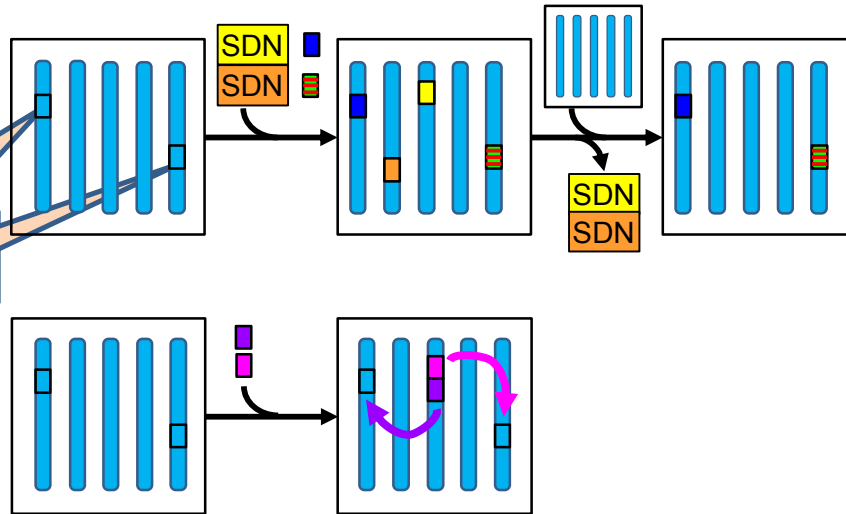
**A GMO or not a GMO?**  
Mutants D and E are not within the scope of the European GMO legislation. Mutant C is not through T-DNA transferred and should be regarded as long as the infection and insert vectors, considered a GMO. The other mutant D and E would require a risk assessment before they can be considered as a GMO. However if they are considered as a GMO, they would not be covered by the same rules as GMOs. The same rules would apply to any other mutants that have been generated by genome editing. The same rules would apply to any other mutants that have been generated by genome editing. The same rules would apply to any other mutants that have been generated by genome editing.

👉 Le Conseil d'Etat a saisi la cours européenne de justice

# CRISPR-Cas9 et transgénèse

CRISPR-Cas9

2 gènes impliqués dans un trait à améliorer



– Précision

- intervention directe sur le gène d'intérêt
- absence d'ADN supplémentaire dans le génome (si SDN ségrégué ou en transitoire)

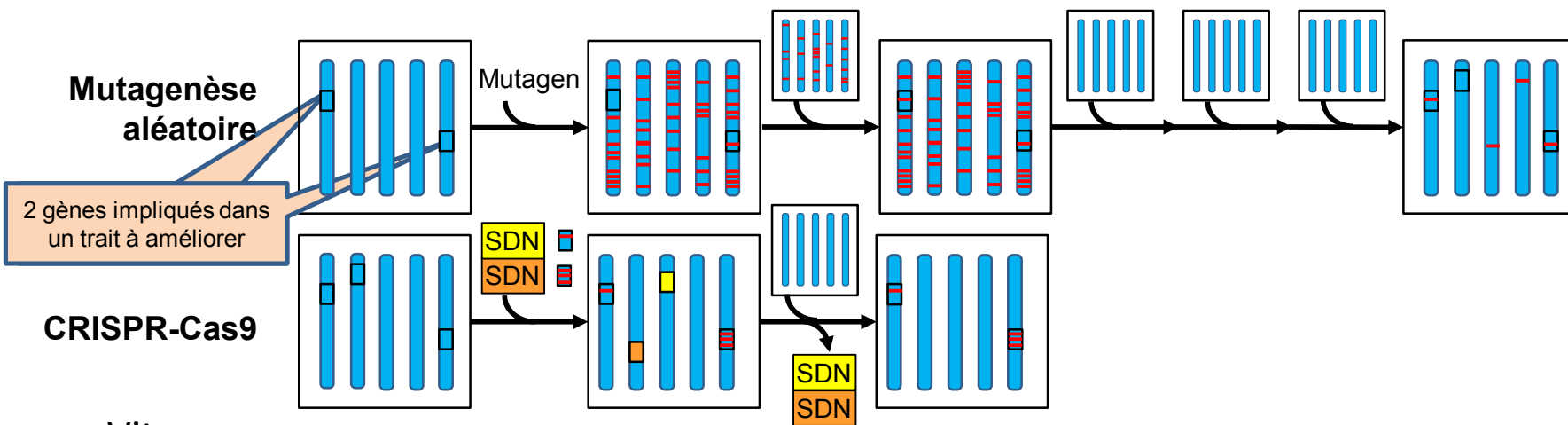
– Limitation

- modification de l'existant

👉 CRISPR-Cas9 est plus précis mais aussi plus limité que la transgénèse



# CRISPR-Cas9 et mutagenèse aléatoire



–Vitesse

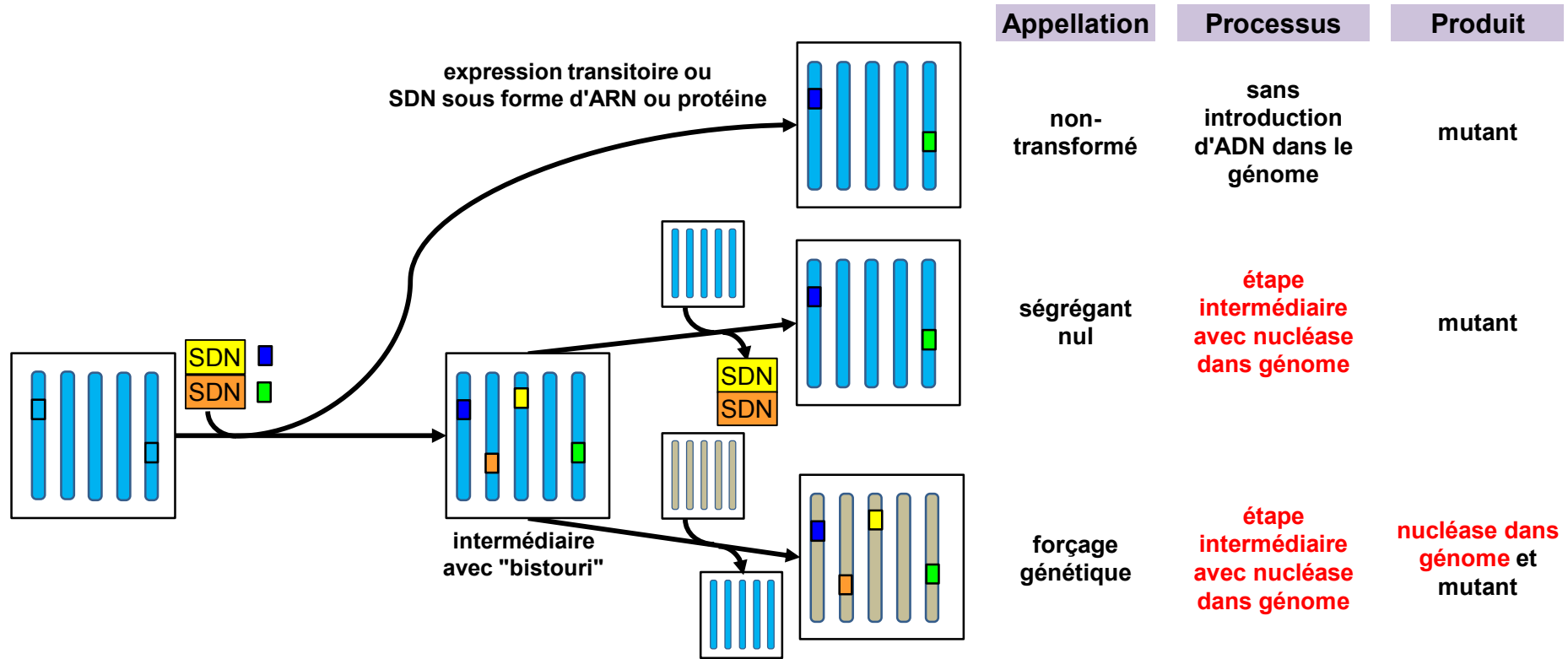
- peu de générations

– Précision

- modifications prédéterminées (pas aléatoires)
- modifications multiples (plusieurs gènes ou plusieurs sites dans un gène)
- peu ou pas de modifications ailleurs dans le génome ("off target")

👉 CRISPR-Cas9 est plus rapide, précise et puissante que la mutagenèse aléatoire

# Statut réglementaire (CRISPR-Cas9)



Les différentes façons d'utiliser CRISPR-Cas9 peuvent influencer leur réglementation



## IV. CRISPR-Cas9 – questions éthiques

# Questions éthiques

- Similaires à celles posées autour des mutants induits et des OGM
- Quel impact sur l'environnement et la santé humaine si l'homme
  - fait une dissémination de plantes avec des caractéristiques de mutants mais obtenues par ingénierie cellulaire?
  - accumule plusieurs mutations dans un seul gène en une seule génération?
  - transgresse la barrière entre espèces?
  - fait une dissémination forcée dans une population ("gene drive")?
  - accélère la fréquence de nouveau matériel génétique dans la nature?
- Etude approfondie risque/bénéfice

 CRISPR-Cas9 ne pose pas de questions éthiques fondamentalement nouvelles

# Conclusion

- CRISPR-Cas9
  - Principes partagés avec sélection classique
    - Mutation
  - Particularités
    - Provocation de modifications ciblées de l'ADN
    - Selon les cas: présence ou pas du transgène nucléase
  - Limites
    - Connaissances préalables
    - Maîtrise de l'ingénierie cellulaire
  - Promesses
    - Précision accrue dans la modification de l'ADN
    - Gain de temps par la diminution du nombre de générations
    - Application à tout trait d'intérêt agronomique ou écologique
    - Elargissement réfléchi de la base génétique





**Merci pour votre attention**