

Transgénèse et nouvelles techniques d'édition du génome

Annabelle Déjardin

Chargée de recherches INRAE

UMR INRAE - ONF BioForA

Biologie intégrée pour la valorisation de la diversité des arbres et de la forêt

annabelle.dejardin@inrae.fr



UMR INRAE - ONF BioForA

Biologie intégrée pour la valorisation de la diversité des arbres et de la forêt

INRAE Val de Loire

<https://www6.val-de-loire.inrae.fr/biofora/>



Equipe « Physiologie Moléculaire de la Formation du Bois »

Thématique de l'équipe :

**Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation du bois
et dans la définition de ses propriétés, chimiques et
mécaniques**

Espèce modèle : Peuplier

Transgénèse et techniques d'édition du génome = méthodes – clé pour
mettre en relation variation de l'expression de gène(s) et modification des propriétés du
bois

Laboratoire d'Ingénierie Cellulaire de l'Arbre

<https://www6.inrae.fr/lica/>

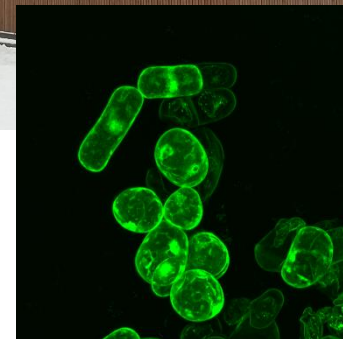
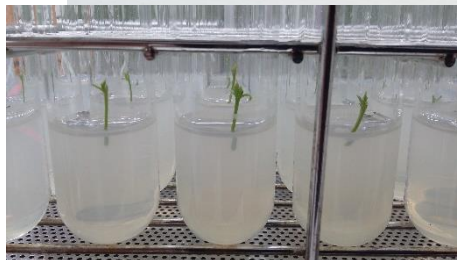
= bâtiment combiné laboratoire – serre, dédié à la production et la caractérisation d'arbres transformés ou édités par ingénierie cellulaire, pour venir en appui à tout projet de biologie intégrative sur le fonctionnement des arbres.

= bâtiment confiné (L2S2) respectant les procédures réglementaires en matière de sécurité biologique.

Visite prévue

**le mercredi 21 avril de 9-11h
dans le cadre des 2h de TP**

**RDV à l'accueil d'INRAE
vers 8h55**



Plan du cours

Introduction

Définitions

Place de ces techniques en amélioration des plantes

Chiffres-clés marché mondial

Partie I. Transgénèse

I.A. Méthodes de production de plantes transgéniques

I.B. Exemples d'applications

I.C. Avantages / Limites technologiques

Partie II. Edition du génome

I.A. Méthodes de production de plantes éditées

I.B. Exemples d'applications

I.C. Développements technologiques actuels

Partie III. Réglementations / Débat sociétal

Conclusion générale

I. Introduction

Glossaire

Transformation génétique = intégration d'un fragment d'ADN étranger dans une cellule, pouvant entraîner une modification héréditaire du phénotype de l'organisme receveur

Transgénèse = fait d'incorporer un ou plusieurs gènes dans le génome d'un organisme vivant. Ce transgène sera exprimé dans l'organisme transformé et peut provenir d'une espèce différente de l'organisme receveur, voire être un gène synthétique

Cisgénèse = sous-catégorie de la transgénèse, pour laquelle, les gènes introduits sont issus de plantes de la même espèce et apportés de manière fonctionnelle, sans réarrangement de séquence, avec l'ensemble de leurs séquences régulatrices et de leurs introns.

Intragénèse = sous-catégorie de la transgénèse, pour laquelle les gènes introduits sont apportés sous forme tronquée ou réarrangée in vitro. Les séquences régulatrices et les introns ne sont pas nécessairement ceux initialement associés au gène, mais chacun des éléments provient de génomes de plantes de la même espèce, ou d'espèces sexuellement compatibles.

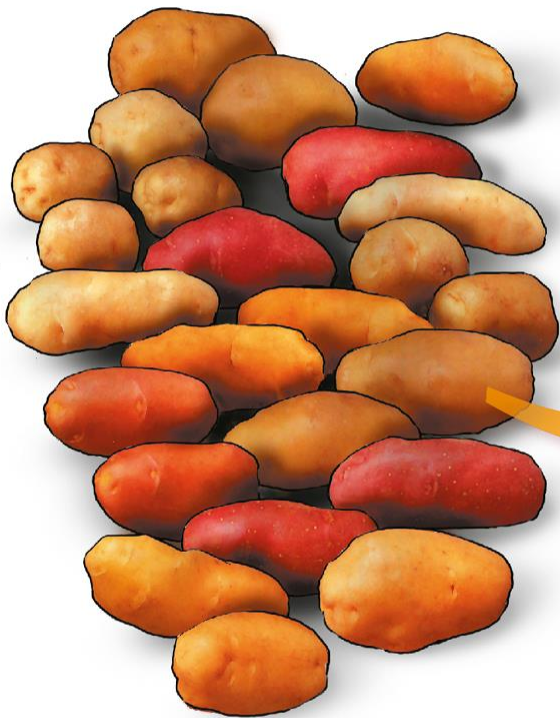
Transgène = Séquence génique provenant d'une espèce non sexuellement compatible à l'organisme receveur.

OGM = Organisme génétiquement modifié / **PGM** = Plante génétiquement modifiée

L'amélioration des plantes s'appuie sur la diversité génétique

Exemple de la pomme de terre

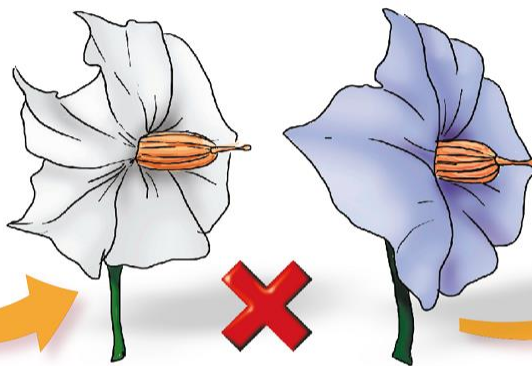
Diversité existante



Collections en France de plus de 10 000 plantes sauvages ou cultivées

Utilisation de la diversité génétique naturelle

Croisement
entre individus choisis
pour leurs caractères intéressants



Nouvelle variété



Objectifs de sélection des variétés

- Plus productives
- Plus résistantes aux maladies et aux parasites
- Mieux adaptées aux sols et aux climats
- Moins sensibles aux stress hydriques
- Régularité des formes
- Qualité culinaire
- Adaptées aux transformations agroalimentaires : frites, chips, pommes de terre surgelées, flocons...
- Qualités féculières : alimentaires, chimie verte...

Les repères historiques de la sélection

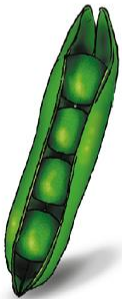
1676

Découverte du rôle des organes sexuels chez les végétaux



1865

Découverte des lois sur l'hérédité par Mendel



1880

Visualisation des chromosomes



1902

Découverte de la totipotence des cellules végétales



G. Haberlandt

1908

Découverte de l'intérêt des hybrides sur le maïs



1953

Description de la structure en double hélice de l'ADN

**J. Watson
F. Crick
R. Franklin**



1960

Découverte du code génétique



1965

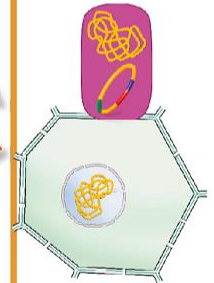
Découverte des enzymes de restriction



1977

Découverte du transfert de gènes par des agrobactéries

**M. Van Montagu
J. Schell**



Possibilité de créer artificiellement de la diversité génétique / introduire des caractères qu'on ne pourrait trouver naturellement

Création de diversité génétique

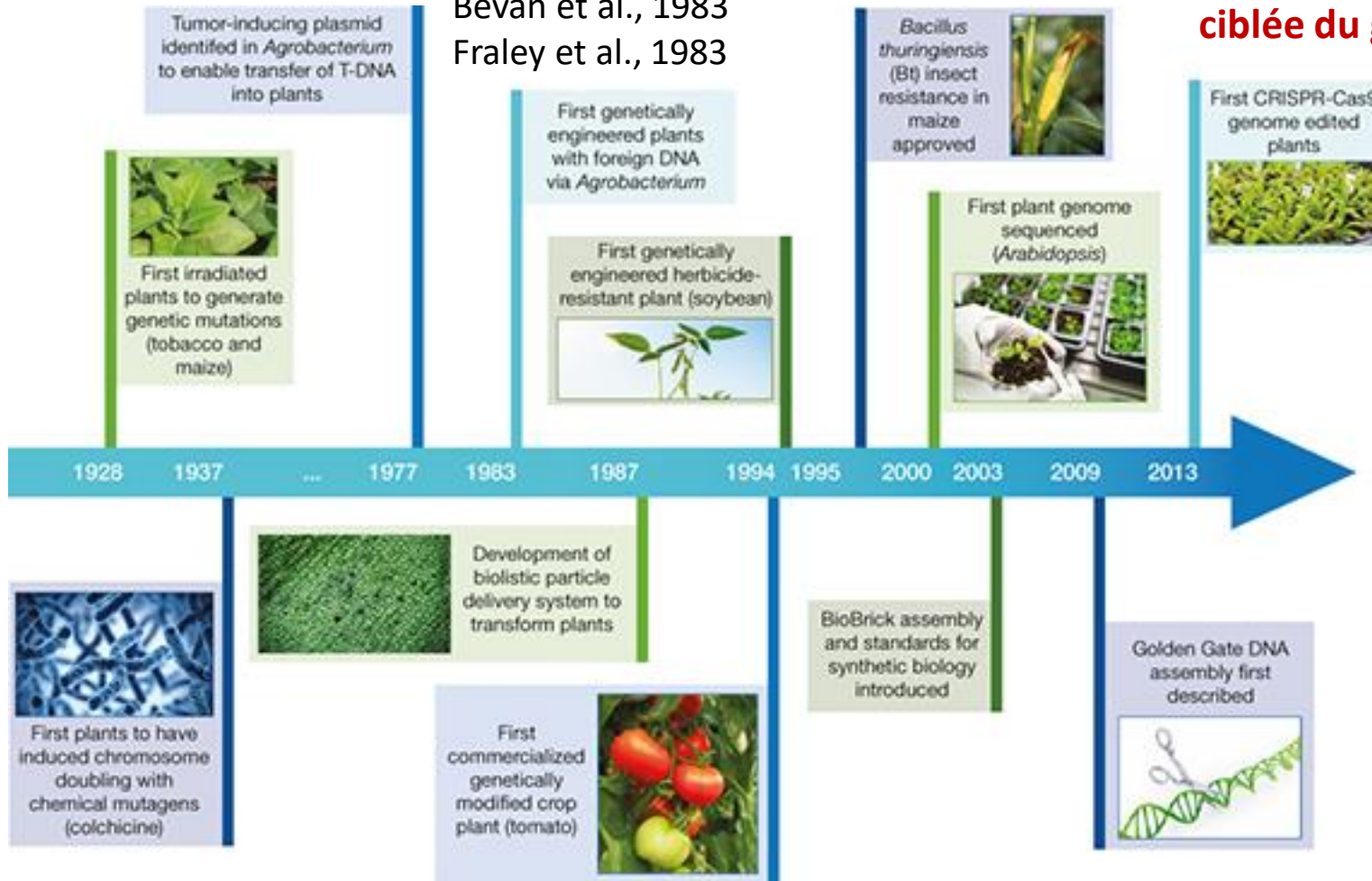
Mutagenèse aléatoire (EMS, UV)

Herrera-Estrella et al., 1983

Bevan et al., 1983

Fraley et al., 1983

Modification ciblée du génome



Transgénèse

Création de diversité génétique

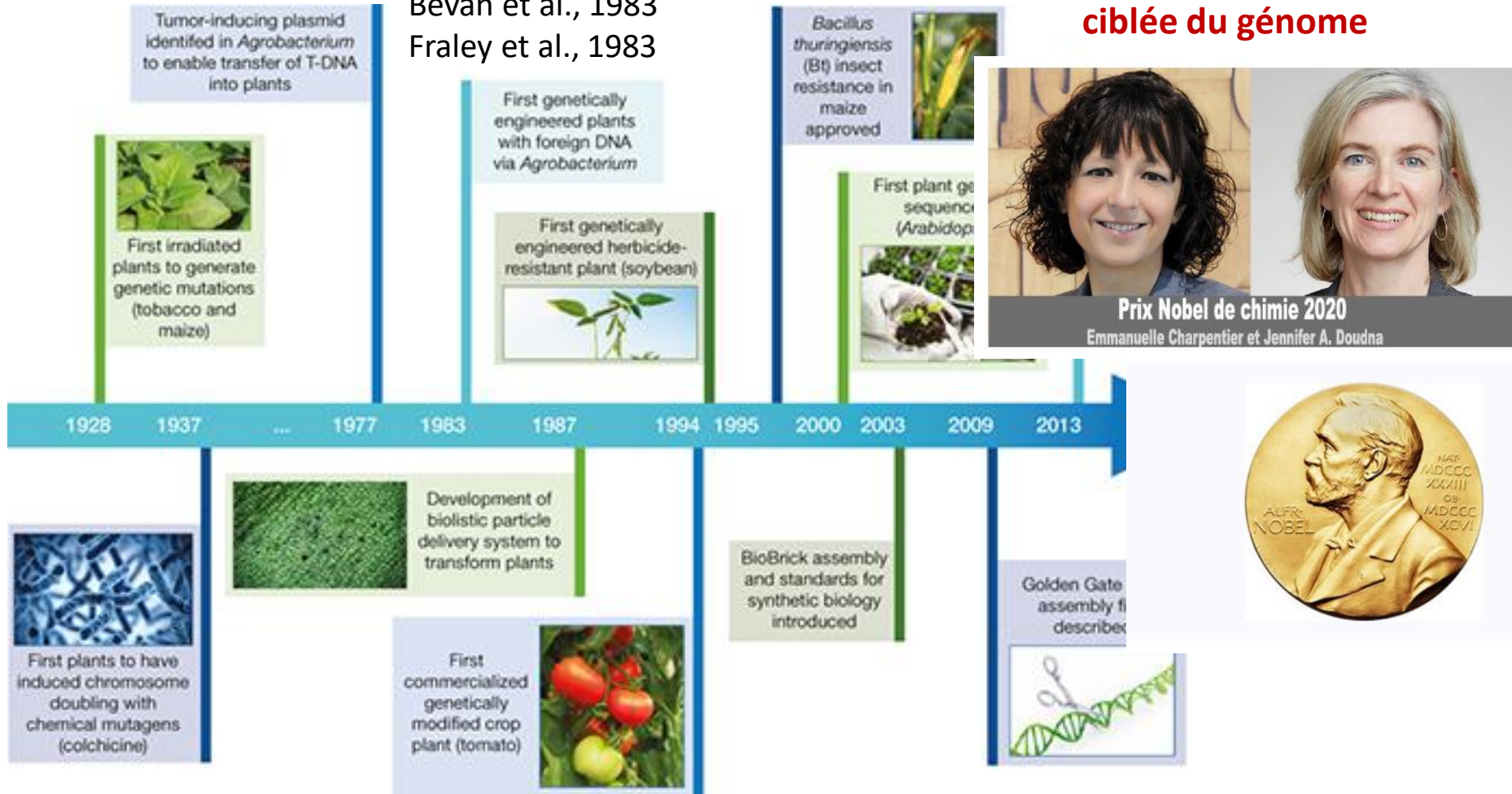
Mutagenèse aléatoire (EMS, UV)

Herrera-Estrella et al., 1983

Bevan et al., 1983

Fraley et al., 1983

Modification ciblée du génome



Transgénèse

Les OGM sont apparus de façon très récente dans l'amélioration des plantes, qui elle, a débuté au Néolithique

Exemple du maïs

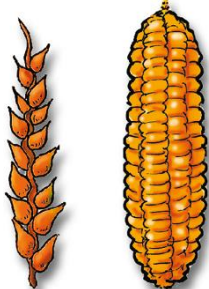
L'ancêtre sauvage



Téosinte

Présence en Amérique

La domestication



Premiers maïs

Apparition au Mexique



L'adaptation en Europe



Populations

Introduction dans le sud de l'Europe



L'extension des zones de culture










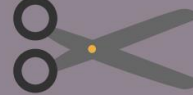

Hybrides

Création des premiers hybrides en France



1^{er} maïs transgénique = 1988

Plantes transgéniques ou éditées = approche biotechnologique complémentaire aux techniques classiques d'amélioration des plantes

How Crops are Genetically Modified				
Traditional Breeding	Mutagenesis	RNA Interference	Transgenics	Gene Editing
<p>Crossing plants and selecting offspring</p>  <p>Desired gene(s) inserted with other genetic material</p> <p>Almost all crops</p>	<p>Exposing seeds to chemicals or radiation</p>  <p>Random changes in genome, usually unpredictable</p> 	<p>Switching off selected genes with RNA</p>  <p>Targeted gene(s) switched off or 'silenced'</p> 	<p>Inserting selected genes using recombinant DNA methods</p>  <p>Only gene(s) inserted at desired locations selected</p> 	<p>When used to delete genes using engineered nucleases (CRISPR, TALENs, ZFNs, etc.)</p>  <p>Desired gene(s) deleted only at known locations</p> 
<p>Number of genes affected: few genes to whole genomes</p>	<p>100s - 1,000s</p>	<p>1 - dozens</p>	<p>1 - 8</p>	<p>1 or more</p>
<p>No safety testing required; Unregulated</p>	<p>No safety testing required; Unregulated</p>	<p>Safety testing required; Highly regulated</p>	<p>Safety testing required; Highly regulated</p>	<p>Safety testing required depending on jurisdiction; Mixed regulations</p>
<p>Undesirable, unintended effects rarely occur in the final product of any crop, regardless which process is used.</p>				

Les domaines d'application de la transgénèse



L'agriculture

- La résistance à des insectes
- La résistance à des maladies
- La tolérance à des herbicides
- La tolérance à la sécheresse
- La tolérance à la submersion
- La meilleure utilisation de l'azote...



L'alimentation

- Les qualités nutritionnelles
- L'enrichissement en minéraux et vitamines
- La maturation des fruits
- La transformation agro alimentaire...

Les domaines d'applications de la transgénèse



L'industrie

- Les pâtes à papier
- Les huiles industrielles
- Les colorants...



La santé

- Les produits sanguins
- Les vaccins
- Les protéines humaines...

Principales cultures OGM dans le monde

Soja



BIOTECH SOYBEANS

FIRST COMMERCIAL PLANTING IN 1996

95.9 MILLION HECTARES
TOTAL AREA IN 2018

APPROVED FOR IMPORT IN
18 COUNTRIES

PLANTED BY FARMERS IN
9 COUNTRIES

USA BRAZIL ARGENTINA
PARAGUAY CANADA URUGUAY
BOLIVIA SOUTH AFRICA CHILE

38 APPROVED EVENTS IN
31 COUNTRIES

SOYBEANS ACCOUNT FOR **50%** OF THE WORLD'S BIOTECH CROP AREA

USA IS THE WORLD'S TOP PRODUCER OF SOYBEANS

BRAZIL IS THE TOP EXPORTER OF SOYBEANS IN THE WORLD

78%

OF SOYBEAN GLOBAL AREA OF 123.5 MILLION HECTARES IN 2018 IS BIOTECH

For more, download: bit.ly/2018Soybeans

Maïs



BIOTECH MAIZE

FIRST COMMERCIAL PLANTING IN 1996

58.9 MILLION HECTARES
TOTAL AREA IN 2018

APPROVED FOR IMPORT IN
15 COUNTRIES

PLANTED BY FARMERS IN
14 COUNTRIES

USA BRAZIL ARGENTINA CANADA PARAGUAY
SOUTH AFRICA URUGUAY PHILIPPINES SPAIN COLOMBIA
VIETNAM HONDURAS CHILE PORTUGAL

137 APPROVED EVENTS IN
35 COUNTRIES

MAIZE EVENT **NK603** RECEIVED **61** APPROVALS FROM **28 COUNTRIES**

30%

OF MAIZE GLOBAL AREA OF 197.2 MILLION HECTARES IN 2018 IS BIOTECH

For more, download: bit.ly/2018Maize

Coton



BIOTECH COTTON

FIRST COMMERCIAL PLANTING IN 1996

24.9 MILLION HECTARES
TOTAL AREA IN 2018

APPROVED FOR IMPORT IN
8 COUNTRIES

PLANTED BY FARMERS IN
15 COUNTRIES

USA BRAZIL ARGENTINA INDIA PARAGUAY
CHINA PAKISTAN SOUTH AFRICA AUSTRALIA MYANMAR
SUDAN MEXICO COLOMBIA COSTA RICA ESWATINI

63 APPROVED EVENTS IN
27 COUNTRIES

INDIA IS TOP COTTON PRODUCER IN THE WORLD

7.5 MILLION FARMERS AND THEIR FAMILIES IN INDIA HAVE ENJOYED THE BENEFITS OF PLANTING BT COTTON

76%

OF COTTON GLOBAL AREA OF 32.9 MILLION HECTARES IN 2018 IS BIOTECH

For more, download: bit.ly/2018Cotton

Canola / Colza



BIOTECH CANOLA

FIRST COMMERCIAL PLANTING IN 1996

10.1 MILLION HECTARES
TOTAL AREA IN 2018

APPROVED FOR IMPORT IN
10 COUNTRIES

PLANTED BY FARMERS IN
4 COUNTRIES

USA CANADA AUSTRALIA CHILE

37 APPROVED EVENTS IN
15 COUNTRIES

95% BIOTECH CANOLA'S ADOPTION RATE IN CANADA

CANADA PLANTED 8.7 MILLION HECTARES BIOTECH CANOLA IN 2018
HERBICIDE TOLERANT

CHILE GROWS BIOTECH CANOLA FOR SEED EXPORT

29%

OF CANOLA GLOBAL AREA OF 34.7 MILLION HECTARES IN 2018 IS BIOTECH

For more, download: bit.ly/2018Canola

Luzerne



BIOTECH ALFALFA

FIRST COMMERCIAL PLANTING IN 2006

1.3 MILLION HECTARES
TOTAL AREA IN 2018

APPROVED FOR IMPORT IN
5 COUNTRIES

PLANTED BY FARMERS IN
2 COUNTRIES

USA CANADA

5 APPROVED EVENTS IN
10 COUNTRIES

CANADA PLANTED **HARVXTRA™** ALFALFA
USA PLANTED **RR® & HARVXTRA™** ALFALFA

HARVXTRA™ ALFALFA

WAS FIRST PLANTED IN 2016

HIGH DEMAND FROM FARMERS

- CONTAINS LESS LIGNIN
- HIGHER DIGESTIBILITY
- OFFERS 15-20% YIELD INCREASE

BIOTECH ALFALFA ADOPTION RATES IN THE USA AND CANADA IS LIKELY TO INCREASE AS MORE AND MORE FARMERS REALIZE THE BENEFITS OF THE TECHNOLOGY IN LIVESTOCK PRODUCTION AND FARM MANAGEMENT.

For more, download: bit.ly/2018Alfalfa



TOP 5 BIOTECH CROPS IN THE WORLD

WWW.ISAAA.ORG

AN ISAAA INFOGRAPHIC BY CLEMENT DIONGLAY

SOURCES: ISAAA Brief 54 (bit.ly/ISAAABrief54)
ISAAA GM Approval Databases (bit.ly/GMApprovalDatabase)
ISAAA Pocket K No. 2 (bit.ly/PKNo2)

NOTE: In these ISAAA resources, the European Union (EU = 28 countries) is counted as one (1) country.

www.facebook.com/isaaa.org/

www.instagram.com/isaaa.org/

www.twitter.com/isaaa_org

JUNE 2020

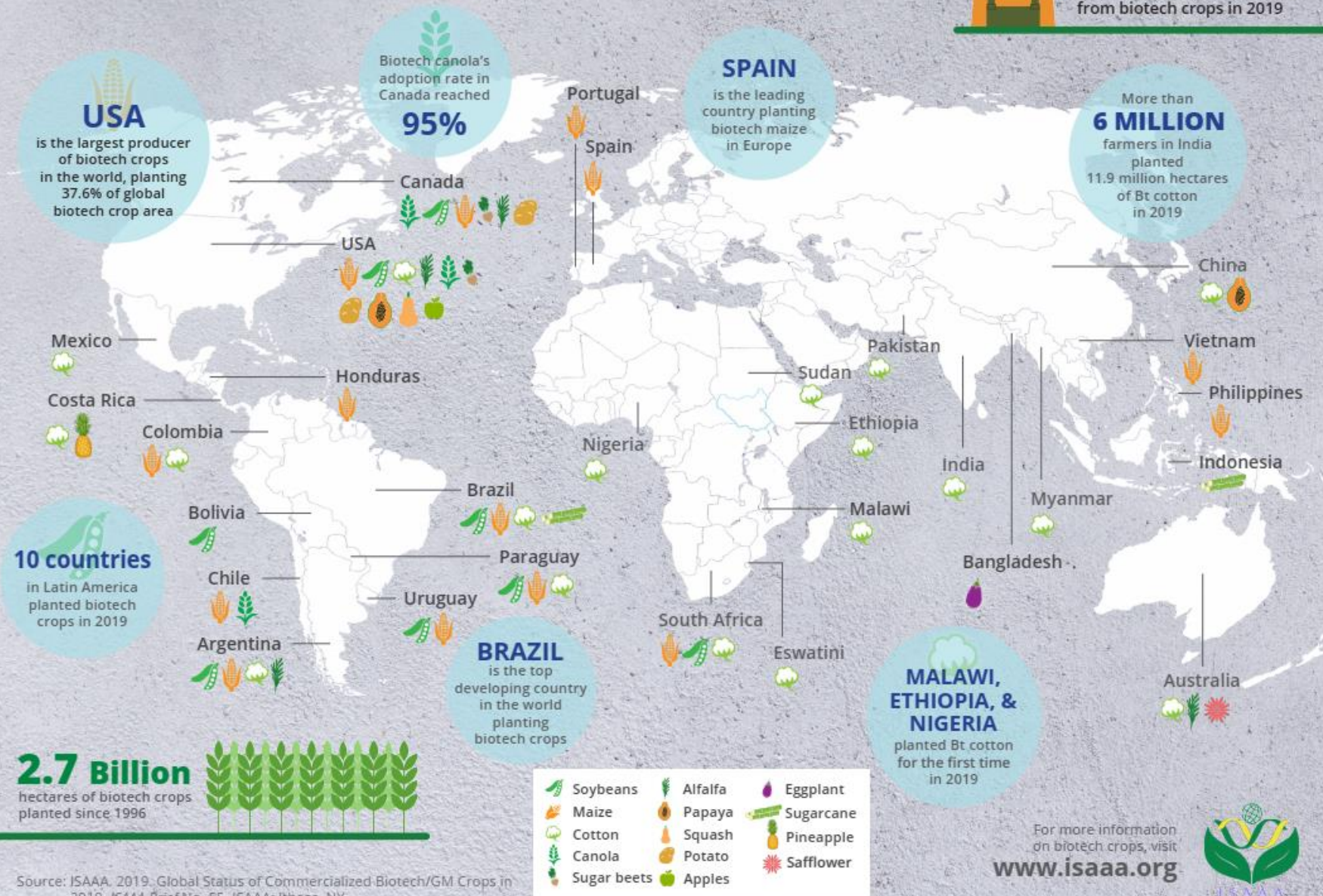
Do you know where biotech crops are grown?

More than 30 countries have planted biotech crops since 1996. See where they were grown in 2019.



17 MILLION

small, resource-poor farmers and their families totaling >65 million people benefited from biotech crops in 2019



2.7 Billion

hectares of biotech crops planted since 1996



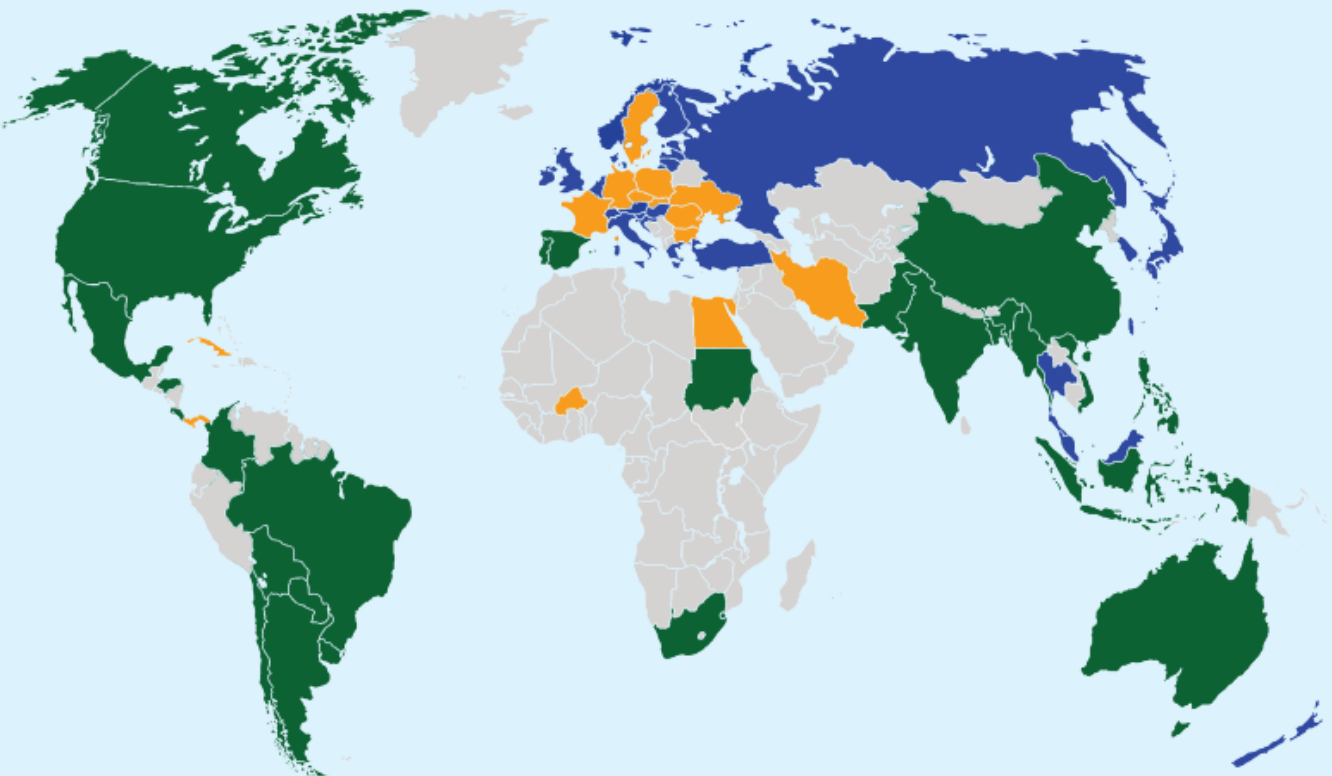
For more information on biotech crops, visit www.isaaa.org



23 Years of Biotech Crops in the World

Since the first year of commercial planting of biotech crops in 1996, more than 70 countries from all over the world have either planted or imported biotech crops.

- The 6 founder biotech crop countries in 1996 are **USA, China, Argentina, Canada, Australia, and Mexico.**
- **Up to 17 million farmers** planted biotech crops in 2018, 95% is from developing countries.
- **26 countries** planted **191.7 million hectares** of biotech crops in 2018, a ~113-fold increase from 1.7 million hectares in 1996.
- In 2018, **26 countries planted** and **44 imported** biotech crops.



■ Countries planting biotech crops in 2018

(USA, Brazil, Argentina, Canada, India, Paraguay, China, Pakistan, South Africa, Uruguay, Bolivia, Australia, Philippines, Myanmar, Sudan, Mexico, Spain, Colombia, Vietnam, Honduras, Chile, Portugal, Bangladesh, Costa Rica, Indonesia, and eSwatini)

■ Countries that stopped planting, currently importing biotech crops

(Bulgaria, Burkina Faso, Czech Republic, Cuba, Egypt, France, Germany, Iran, Panama, Poland, Romania, Slovakia, Sweden, and Ukraine)

■ Countries not planting, but importing biotech crops

(Austria, Belgium, Croatia, Cyprus, Denmark, Estonia, Finland, Greece, Hungary, Ireland, Italy, Japan, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malaysia, Malta, Netherlands, New Zealand, Norway, Russian Federation, Singapore, Slovenia, South Korea, Switzerland, Taiwan, Thailand, Turkey, and United Kingdom)

- ISAAA. 2018. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2018. *ISAAA Brief No. 54*. ISAAA: Ithaca, NY.
- ISAAA GMO Approval Database (<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>).

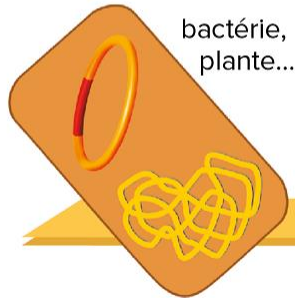
For more information
on biotech crops, visit
www.isaaa.org



I.A. Méthodes d'obtention de plantes transgéniques

Les étapes de la transgénèse

Identifier
un gène d'intérêt
sur un organisme donneur



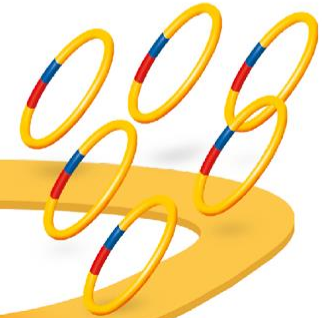
Isoler
le gène d'intérêt



Intégrer
le gène d'intérêt dans une
construction génétique



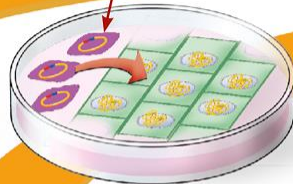
Multiplier
la construction
génétique



Transfert direct



**Transformation
biologique**
Agrobacterium



Transférer
le gène



**Sélectionner les cellules
transformées**

Régénérer



Evaluer
l'expression
du gène



Incorporer
par des croisements
dans une variété
commerciale



Exemple pour le peuplier : transformation via *agrobacterium tumefaciens*



P. tremula x *P. alba*
clone INRA #717-1B4

**Coculture entre-
nœuds blessés /
agrobactéries**

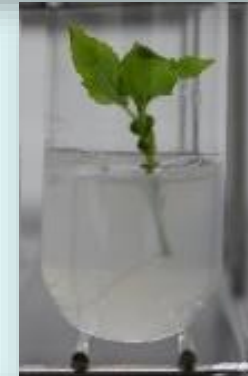
6 mois

Acclimatation



Callogénèse

Enracinement



**Régénération de
tiges feuillées**



Sélection



Toutes les espèces / génotypes au sein d'une espèce n'ont pas la même aptitude à la transformation et à la régénération

The Plant Cell, Vol. 28: 1998–2015, September 2016, www.plantcell.org © 2016 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

BREAKTHROUGH REPORT

Morphogenic Regulators *Baby boom* and *Wuschel* Improve Monocot Transformation^{OPEN}

Keith Lowe,^a Emily Wu,^a Ning Wang,^a George Hoerster,^a Craig Hastings,^a Myeong-Je Cho,^b Chris Scelonge,^a Brian Lenderts,^a Mark Chamberlin,^a Josh Cushatt,^a Lijuan Wang,^a Larisa Ryan,^a Tanveer Khan,^c Julia Chow-Yiu,^a Wei Hua,^a Maryanne Yu,^b Jenny Banh,^b Zhongmeng Bao,^a Kent Brink,^d Elizabeth Igo,^d Bhojaraja Rudrappa,^e PM Shamseer,^e Wes Bruce,^f Lisa Newman,^a Bo Shen,^a Peizhong Zheng,^g Dennis Bidney,^a Carl Falco,^a Jim Register,^a Zuo-Yu Zhao,^a Deping Xu,^a Todd Jones,^a and William Gordon-Kamm^{a,1}

^a DuPont Pioneer, Johnston, Iowa 50131

^b DuPont Pioneer, Hayward, California 94545

^c Fruhling Biosciences, West Marredpally, Secunderabad, Telangana 500026, India

^d DuPont, DuPont Experimental Station, Wilmington, Delaware 19803

^e DuPont Knowledge Center, Hyderabad-500078, India

^f BASF Plant Science, Research Triangle Park, North Carolina 27709

^g Dow AgroSciences, Indianapolis, Indiana 46268

Baby boom et Wuschel = facteurs de transcription impliqués dans la totipotence cellulaire et l'embryogenèse

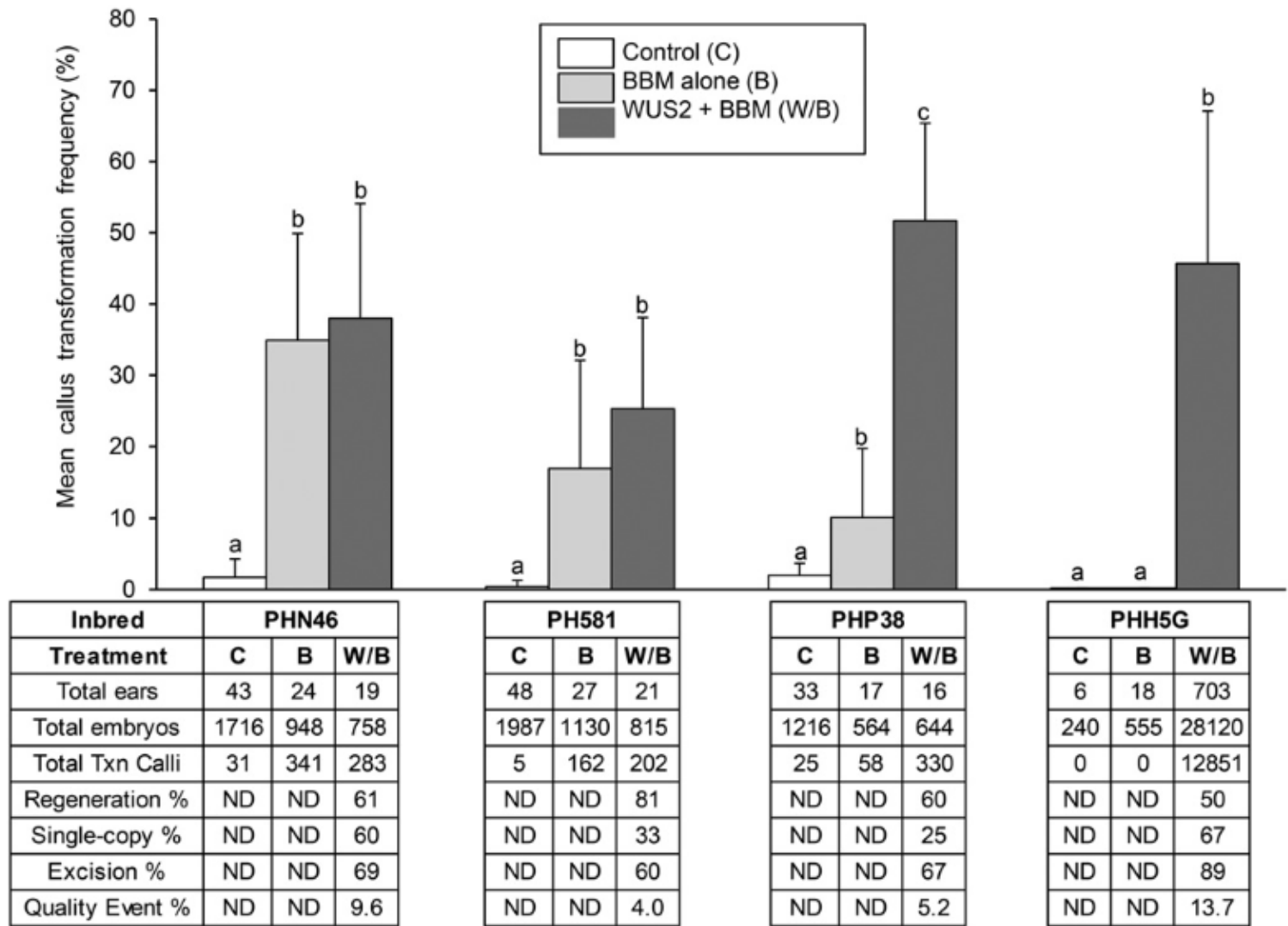


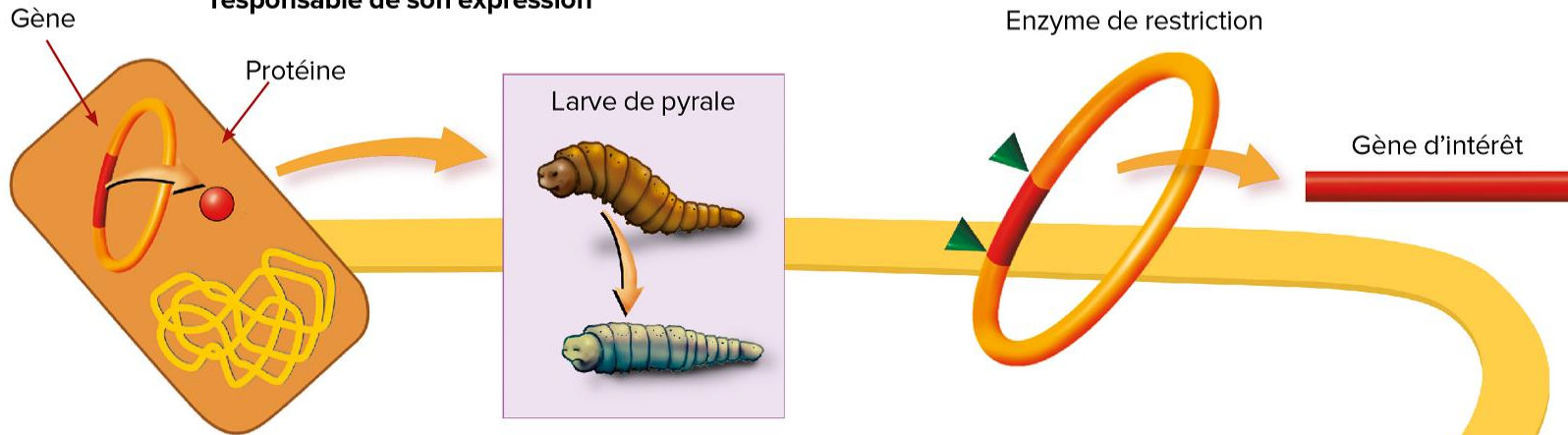
Figure 2. Ectopic Expression of *Bbm* and *Wus2* Increased Transformation Frequencies in Four Maize Inbreds.

La réalisation de la construction génétique

Identifier le gène d'intérêt

Repérer un caractère intéressant
Identifier la protéine et le gène
responsable de son expression

Isoler le gène d'intérêt



Bactérie « Bt »

Intégrer le gène d'intérêt dans une construction génique

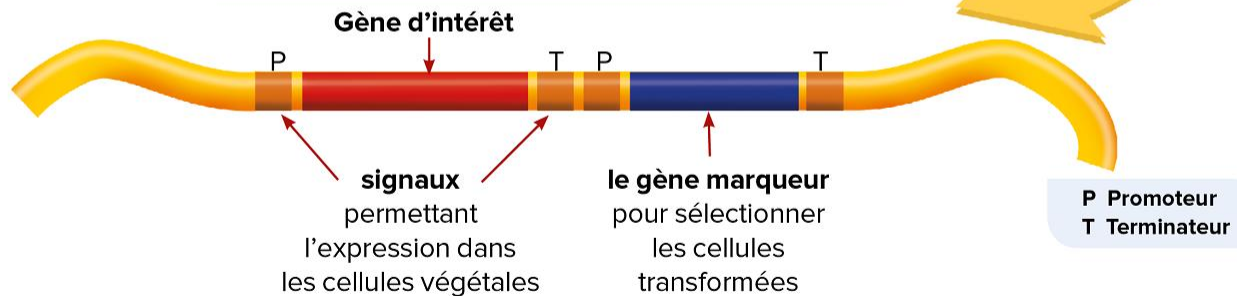


Table 1 Characteristics of the promoters and *cis*-acting elements

Sequence/type	Origin	Function	Application/reference
Promoters			
<i>CaMV 35S</i>	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	Constitutive in dicots	Herbicide-resistant Bt corn (Saxena et al. 2004)
<i>ScBV</i>	<i>Sugarcane bacilliform virus</i>	Constitutive in monocots and dicots	Biodiesel and bioethanol production in monocots and dicots (Borysyuk et al. 2013)
<i>ZmUbi1</i>	<i>Zea mays</i> Ubiquitin gene	Constitutive in monocots	Expression of herbicide tolerance genes in corn (Lira et al. 2011)
<i>PvUbi1</i> and <i>PvUbi2</i>	<i>Panicum virgatum</i> Polyubiquitin chains genes	Constitutive	Mann et al. (2011)
<i>OsAct1</i>	<i>Oryza sativa</i> Actin gene	Constitutive	Modification of fructan biosynthesis in forage grasses (Spangenberg et al. 2010)
<i>Act2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> Actin gene (modified)	Constitutive (except hypocotyl, seed coat and microsporangia)	Phytochelatin expression to obtain metal-resistant plants for phytoremediation (Meagher and Li 2002)
<i>LMWG1D1</i>	<i>Triticum aestivum</i> Glutenin gene	Endosperm-specific	Stoger et al. (1999)
<i>Gt1</i>	<i>Oryza sativa</i> Glucelin gene	Endosperm-specific	Transferrin production in rice seeds (Zhang et al. 2010)
<i>zE19</i>	<i>Zea mays</i> Zein gene	Cotyledon-specific	Chen et al. (2007)
β -Conglycinin promoter	<i>Glycine max</i>	Seed-specific, peak of activity in the middle and late phase of seed maturation	Cyanovirin-N production in soybean seeds (O'Keefe et al. 2015)
α -Globulin promoter	Cotton	Seed-specific, peak of activity in the middle and late phase of seed maturation	Reduction of gossypol content in cottonseed (Sunilkumar et al. 2006)
<i>PsGNS2</i>	<i>Pisum sativum</i> β -1,3-glucanase gene	Seed coat-specific	Labelling GM seeds (Buchner et al. 2002)
<i>E8</i>	Different tomato species	Fruit-specific, ethylene-inducible	Production of cholera toxin B in <i>Lycopersicon esculentum</i> (He et al. 2008)
<i>TA29</i> <i>A9</i>	<i>Tobacco</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	Anthers-specific	Male sterility (Koltunow et al. 1990; Paul et al. 1992)
<i>PAT1</i> and <i>B33</i>	<i>Solanum tuberosum</i> Patatin class I genes	Tuber-specific	β -Carotene expression in potato tubers to improve their nutrition value (Diretto et al. 2007)
ABRE (ABA-responsive element)	Various species	ABA-inducible	Bonetta and McCourt (1998)
<i>alcR</i> and <i>aclA</i> system	<i>Aspergillus nidulans</i> Ethanol-inducible TF and alcohol dehydrogenase genes	Ethanol- and acetaldehyde-inducible	Caddick et al. (1998)
<i>pin2</i>	<i>Solanum tuberosum</i> Proteinase inhibitor II gene	Wound-inducible	Keil et al. (1990)
<i>PtDri02</i>	<i>Populus tremula</i> Cellulose synthase gene	Xylem-specific	Bidirectional promoters (Zheng et al. 2011)
<i>HaFAD2-1</i>	Sunflower	Seed-specific	Strong expression in seeds equal to <i>CaMV 35S</i> (Zavallo et al. 2010)
<i>PRP1</i> group	Various plants	Pathogen inducible	Pathogen response (Mehrotra et al. 2011)
<i>CaMV 35S</i> core promoter and <i>cis</i> elements	Synthetic	Phytohormones inducible	Fast and easy indication of plant pathogen infections <i>in vivo</i> (Mehrotra et al. 2011)
<i>SK2</i>	<i>Solanum tuberosum</i> Endochitinase gene	Pistil-specific	Ficker et al. (1997)
<i>CHS15</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> Chalcone synthase gene	Petal-specific	Faktor et al. (1996)
<i>TohRB7</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> Aquaaporin gene	Root-specific	Nematode-resistant tobacco (Yamamoto et al. 1991; Ravichandra 2014)

Bilas et al., 2016

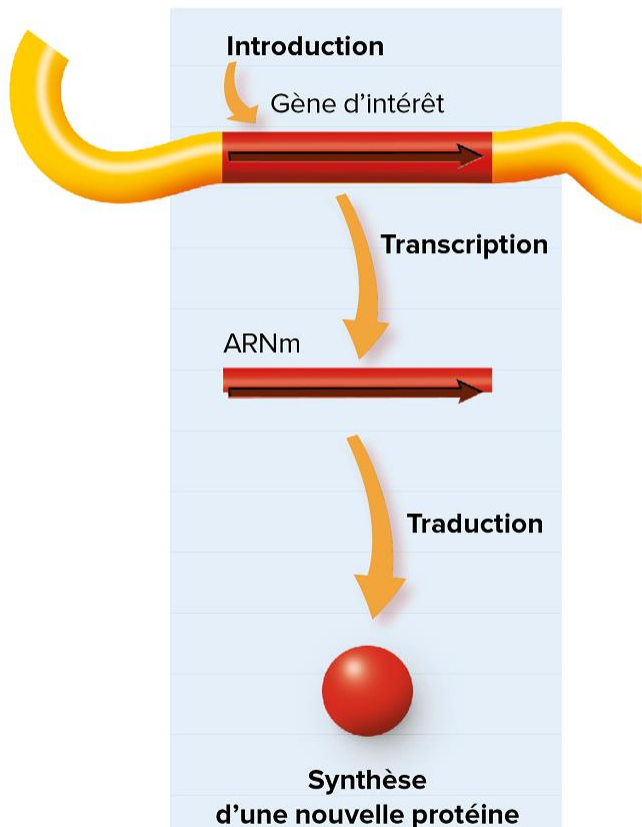
Importance du choix des séquences régulatrices : expression constitutive, spécifique à un organe donné, à un stade de développement, en réponse à une contrainte environnementale

Table 1 (continued)

Sequence/type	Origin	Function	Application/reference
<i>lat52</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> Cysteine-rich protein gene	Pollen-specific	Pollen labelling with orange fluorescent protein in transgenic <i>Nicotiana</i> hybrid plants (Twell et al. 1989; Hollis Rice et al. 2013)
ACC oxidase promoter	<i>Malus sylvestris</i> ACC oxidase gene	Fruit-specific	Atkinson et al. (1998)
Enhancers			
<i>CaMV 35S</i>	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	Specific promoters gain enhanced and constitutive activity	Yang et al. (2011)
<i>LAT52</i> <i>AGL5</i>	<i>Brassica</i> pollen <i>Brassica</i> carpel	Specific promoters gain added enhancer specificity	Construction of enhancer-promoter chimeras (Yang et al. 2011)
3'UTR	Maize <i>cr1RB1</i> gene	Increasing of the protein translation and accumulation level	β -Carotene production and accumulation in maize seeds (Vignesh et al. 2013)
3'UTR	<i>Oryza sativa</i> SSP genes	Intensification of transcription and translation, mRNA stabilization	Recombinant proteins production and accumulation in seeds (Li et al. 2012)
Insulators			
<i>TBS</i> <i>EXOB</i>	<i>Petunia hybrida</i> <i>Aphage</i>	Enhancer-promoter insulator	Yang et al. (2011)
Signal sequences			
<i>NLS/NES</i>	Synthetic	Directing of a product in/out of nucleus	Sorting of a resistance proteins transformation (Huang et al. 2014)
<i>KDEL</i>	Synthetic	Directing of a product to ER and accumulation	Production of a <i>Dengue virus</i> vaccines and antibodies in <i>N. tabacum</i> and <i>M. citrifolia</i> (Martinez et al. 2011) Production of a phytase in <i>B. napus</i> (Peng et al. 2006) Production of a mouse antibodies 14D9 in <i>N. tabacum</i> (López et al. 2010) Production of a 7Crp vaccine against allergens using <i>O. sativa</i> (Takaiwa et al. 2009)

La transgénèse : différentes stratégies

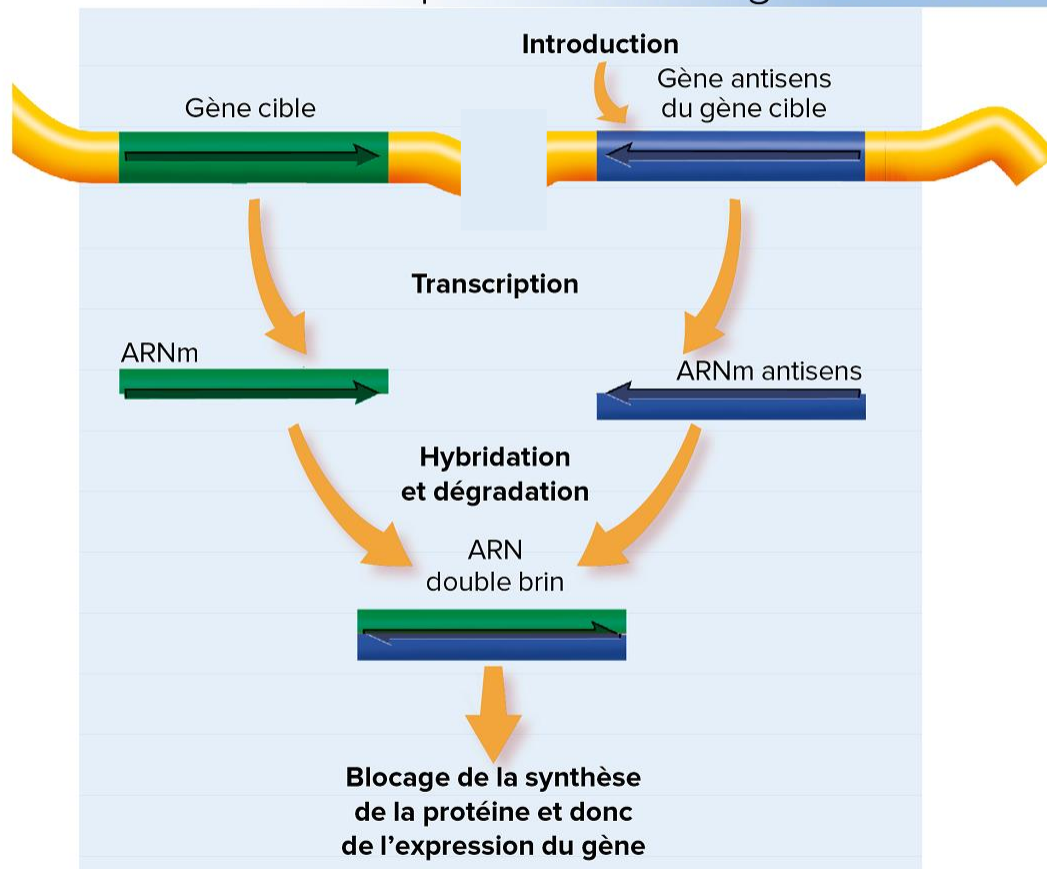
Introduire un nouveau caractère



Ex : introduction gènes de résistance aux insectes, gènes de tolérance à des herbicides, modification de la composition des graines

Inactiver un caractère

Exemple de la stratégie antisens

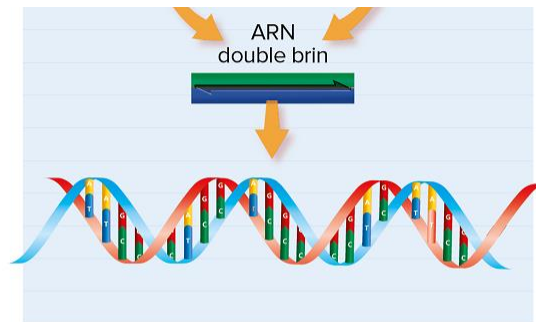


Ex : tomates et melons à maturation retardée, plantes à teneur en lignines réduites

Principe de l'inactivation d'un gène par ARN interférent (ARNi)

- 1 Production d'un ARN double brin (ARN db) par transgène

Introduction d'une construction génétique permettant la production d'un ARN double brin en tête d'épingle (hairpin RNA)



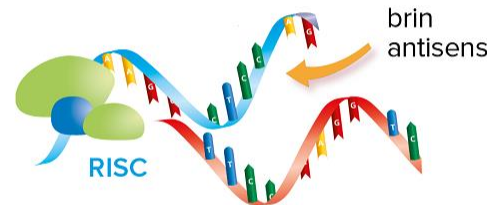
- 2 La protéine Dicer présente dans le cytoplasme reconnaît et fractionne les ARNdb en petits ARN db



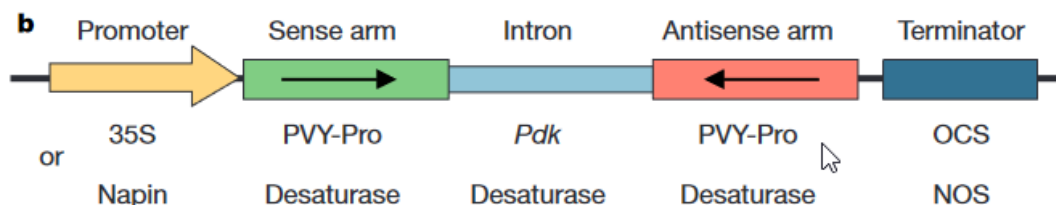
Le petit brin d'ARN correspondant au gène ciblé est dégradé



- 3 La protéine RISC présente dans le cytoplasme sépare les deux brins d'ARN



Le brin d'ARN antisens (appelé ARN interférent) reste lié à la protéine RISC



Ex : plantes résistantes aux virus

Transgènèse / Cisgènèse / Intragènèse

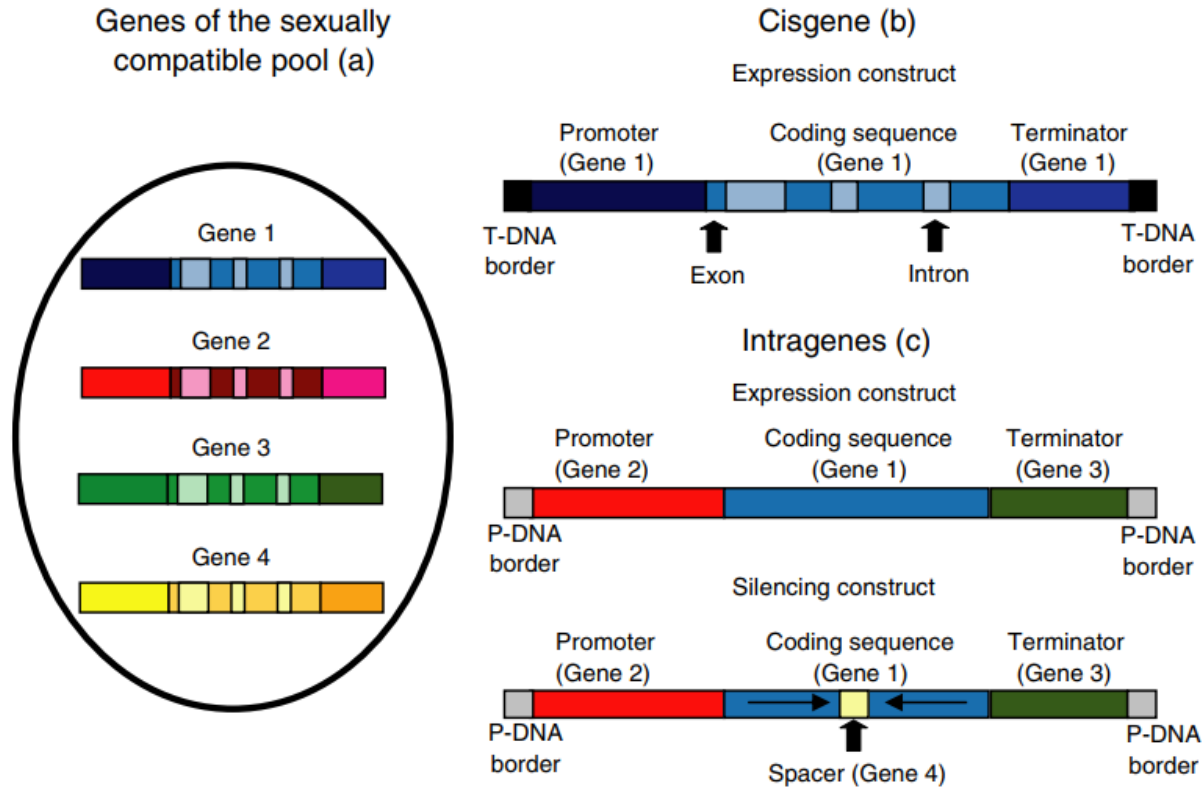
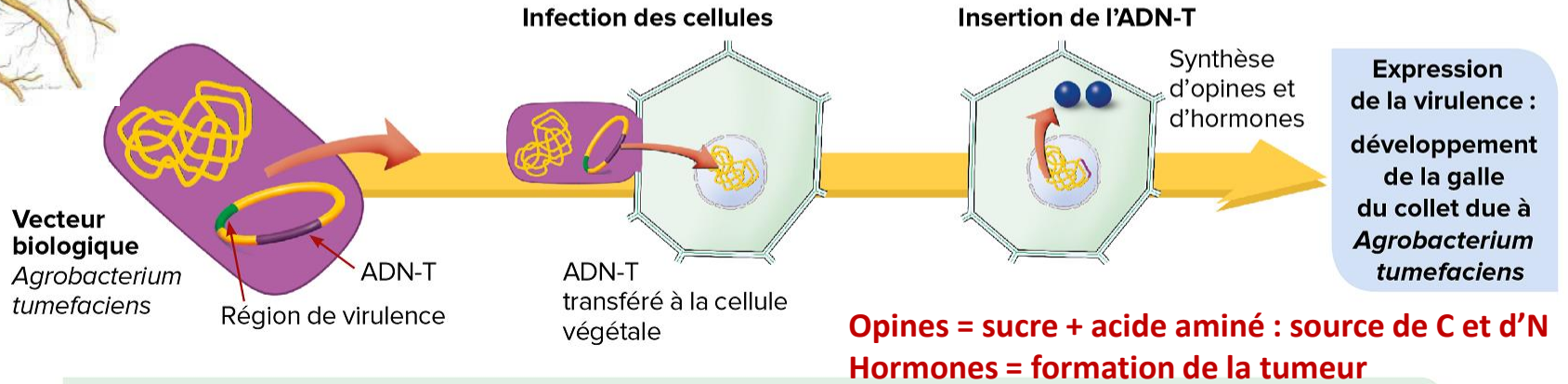


Figure 1 Illustration of cisgene and intragene constructs as defined by Schouten *et al.*, (2006a) and Rommens (2004), respectively. The cisgene is an identical copy of a gene from the sexually compatible pool including promoter, introns and terminator (a,b). When using *Agrobacterium*-mediated transformation the cisgene is inserted within *Agrobacterium*-derived T-DNA borders. Intragenesis allows *in vitro* recombination of elements isolated from different genes within the sexually compatible gene pool (a,c). Furthermore, there is no requirement for introns and cDNA or fragments of genes can be used. Thus, both expression and silencing intragenic constructs can be designed. According to the definition of Rommens (2004), the intragene should be inserted within borders isolated from the sexually compatible DNA pool (P-DNA borders), when using *Agrobacterium*-mediated transformation.

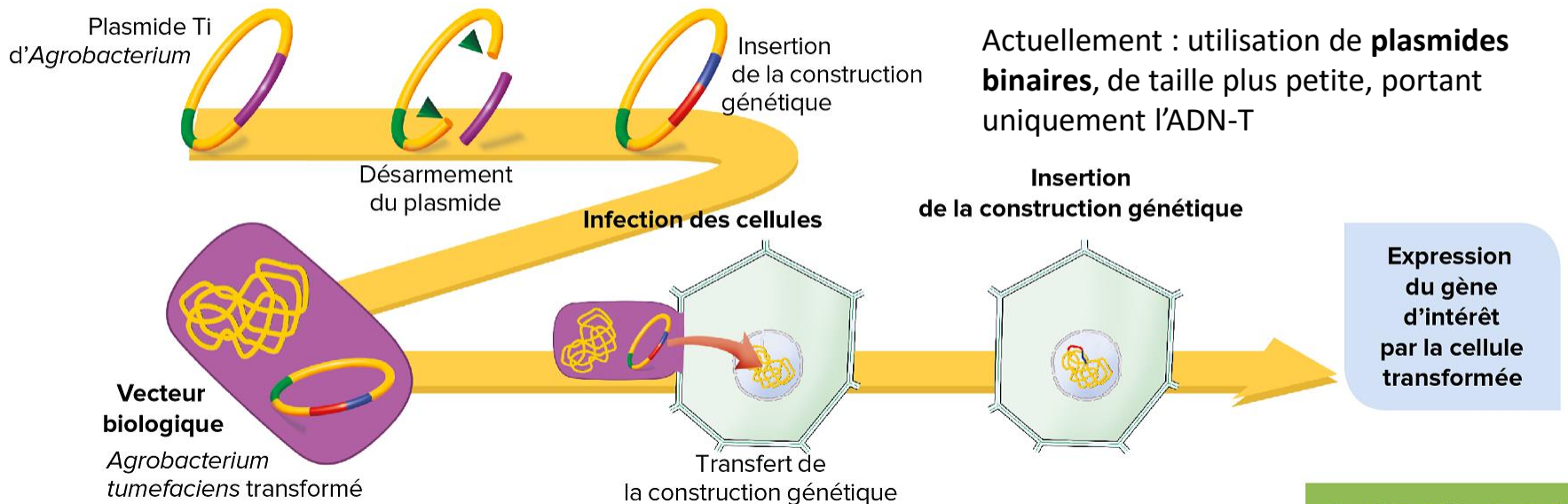


L'utilisation d'*Agrobacterium*

Transfert naturel de l'ADN-T par *Agrobacterium tumefaciens*



Transfert naturel de la construction génétique par *Agrobacterium tumefaciens*



Mécanismes d'intégration du T-DNA dans le génome de la plante

Lacroix et Citovsky, 2019

AS = Acétosyringone, composé phénolique relargué par les cellules végétales blessées

VirA/virG : système à 2 composants

T-DNA sur le plasmide Ti: encadré par bordures LB / RB (inverted repeats de 20-25 pb). VirD1/virD2 reconnaissent spécifiquement LB et RB

DSB = Double Strand Break = Cassure Double Brin

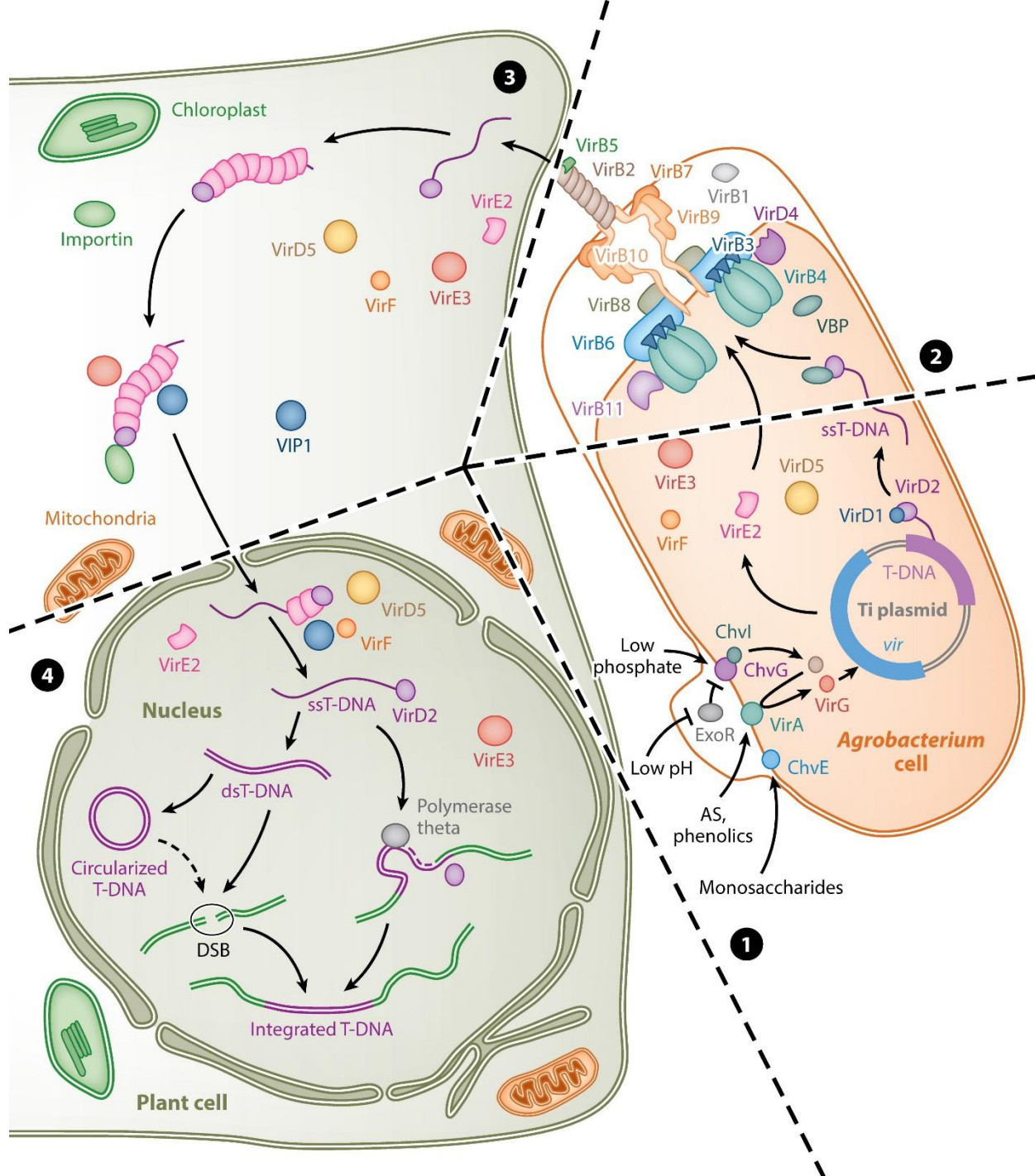


Figure 1

Schematic representation of the main steps of T-DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant cell genome. Circled numbers represent the major steps in the pathway. ❶ Plant-derived and environmental signals activate the bacterial virulence system, resulting in the induction of *vir* (virulence) gene expression and the generation of the single-stranded T-DNA. ❷ The T-DNA, covalently attached to VirD2, and several *vir*-encoded effector proteins (VirD5, VirE2, VirE3, and VirF) are exported out of the bacterial cell via the VirB/VirD4 T4SS. ❸ T-DNA and effector proteins enter in the plant cell and are targeted into the nucleus. ❹ The T-DNA is processed in the nucleus and integrated into the plant cell chromosomal DNA.

Abbreviations: AS, acetosyringone; Chv, chromosomal virulence protein; DSB, double-strand break; dsT-DNA, double-stranded transferred DNA; Exo, exocellular; ssT-DNA, single-stranded transferred DNA; T-DNA, transferred DNA; T4SS, type IV secretion system; Ti plasmid, tumor-inducing plasmid; *vir*, virulence gene region; Vir, virulence protein; VBP, VirD2 binding protein; VIP1, VirE2 interacting protein 1.

Exemple pour le peuplier : transformation via *agrobacterium tumefaciens*



P. tremula x *P. alba*
clone INRA #717-1B4

**Coculture entre-
nœuds blessés /
agrobactéries**

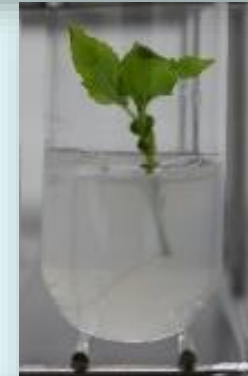
6 mois

Acclimatation



Callogénèse

Enracinement



**Régénération de
tiges feuillées**



Sélection



Le transfert direct

La biolistique



Le canon à particules



Projection de microparticules enrobées des constructions génétiques sur les tissus de la plante

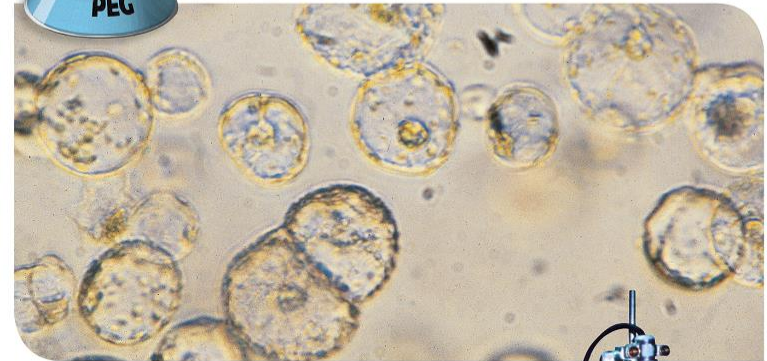
Insertion de nombreuses copies d'ADN, dont certaines sont tronquées

Le transfert dans les protoplastes



L'action du PolyÉthylène Glycol (PEG)

Polymère facilitant le transfert de l'ADN à travers les membranes des protoplastes



L'électroporation

Chocs électriques perméabilisant la membrane des protoplastes

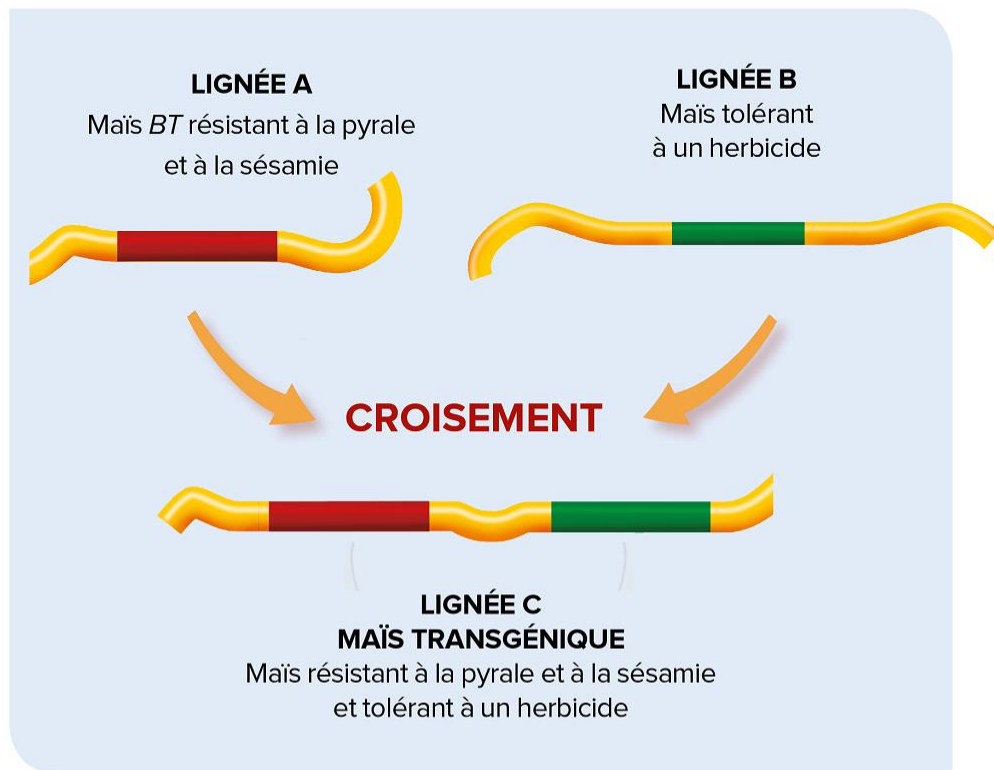


Très difficile de régénérer des plantes à partir de protoplastes

Les gènes combinés et les gènes empilés

Gènes Combinés

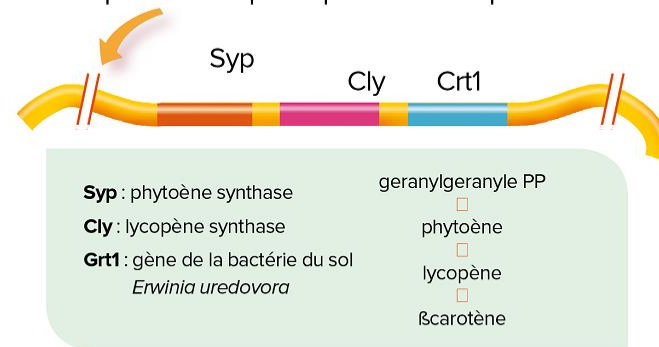
croisement de deux lignées transgéniques



Gènes empilés

intégration de plusieurs transgènes
simultanément

3 transgènes pour synthétiser le β carotène
à partir du geranylgeranyl PP
promoteur spécifique de l'endosperme



+ génome du riz



L'obtention d'une variété OGM

Régénération
des plantes après
transformation

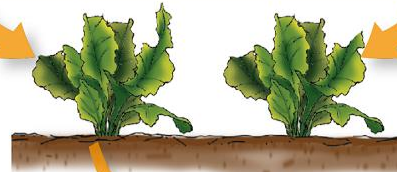


Différents événements
de transformation

Caractérisation
moléculaire et biochimique
des transformants

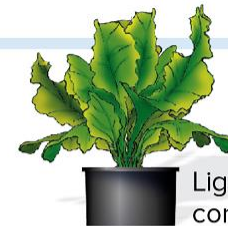


Évaluation
de la valeur agronomique
de la plante



Introgression
dans une lignée
commerciale élite

Lignée mère



Lignée
commerciale élite

Obtention
d'une variété OGM



Variété
transgénique

Rétrocroisements



I.B. Exemples d'applications

Ex 1 Plantes transgéniques Bt, résistantes aux insectes

Maïs, Coton



Source photos : isaaa.org

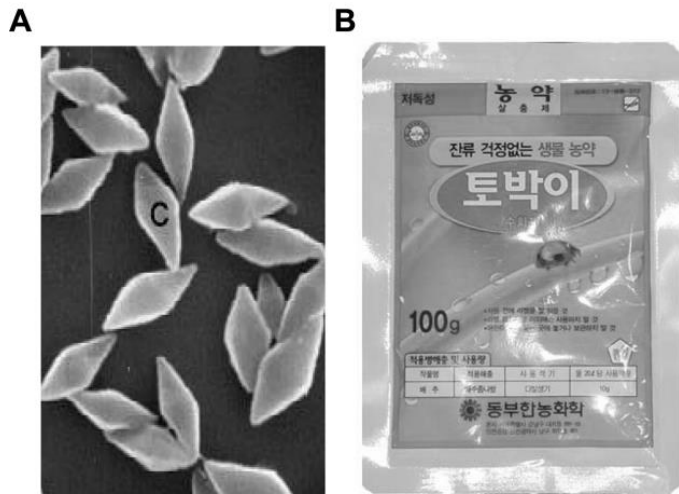
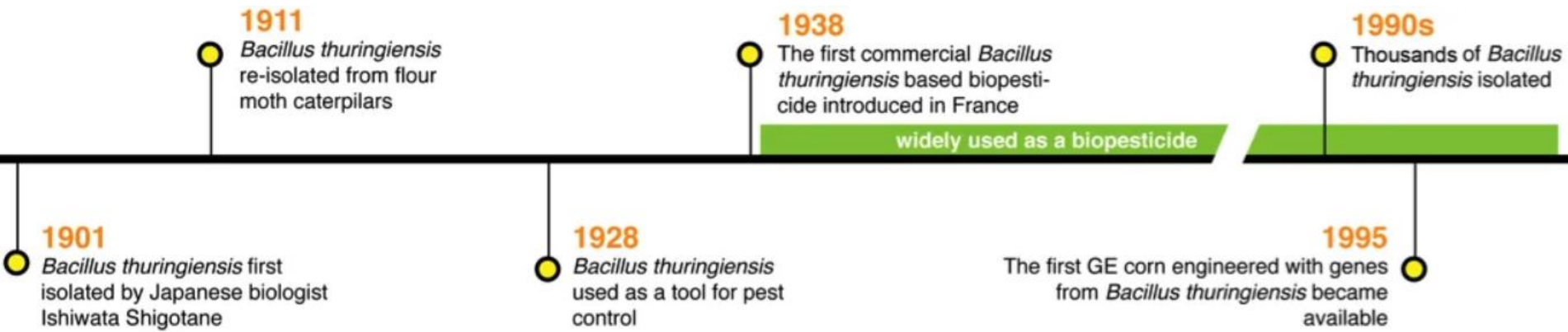
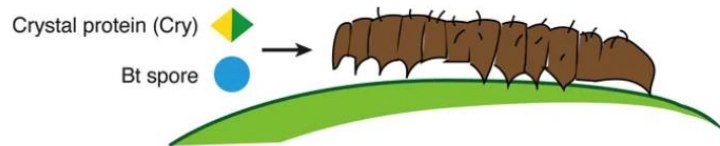


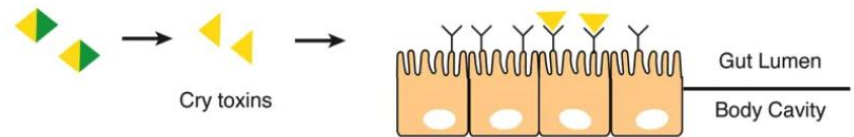
Fig. 2. Crystal proteins (A) and a biopesticide product (B) of *Bt* subsp. *kurstaki* NT0423. A. C indicates crystal inclusions by scanning electronic microscopy. B. The commercialized product name is “Tobaggi” from Dongbu Hannong Chemicals.

Roh et al., 2007

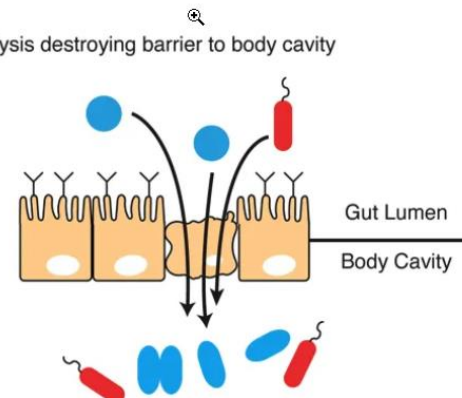
(A) Larvae ingest *Bt* spores and Cry proteins



(B) In larval midgut, proteolytic digestion of proteins release Cry toxins, which bind to epithelial receptors



(C) Toxin binding causes cell lysis destroying barrier to body cavity





See all events of crop:

Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)

See all events developed by:

Monsanto Company (including fully and partly owned companies)

See all events with trait introduction method:

Agrobacterium tumefaciens-mediated plant transformation

See all events with commercial trait:

Insect Resistance

See all events with GM trait:

Lepidopteran insect resistance

Antibiotic resistance

See all events with gene:

cry1Ac

nptII

aad

Lists

Crops List

Events List

Genes List

GM Traits List

Commercial Traits List

Event Name: MON757

Event Code : MON-ØØ757-7

Trade Name: Bollgard™ Cotton

Crop: *Gossypium hirsutum* L. - Cotton

Basic Information

Authorizations

Documents and Links

Developer:

[Monsanto Company \(including fully and partly owned companies\)](#)

Method of Trait Introduction:

[Agrobacterium tumefaciens-mediated plant transformation](#)

GM Trait s :

[Lepidopteran insect resistance](#) , [Antibiotic resistance](#)

Commercial Trait:

(Singular) [Insect Resistance](#)

Summary of Basic Genetic Modification

Gene Introduced	Gene Source	Product	Function
cry1Ac	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki strain HD73	Cry1Ac delta-endotoxin	confers resistance to lepidopteran insects by selectively damaging their midgut lining
nptII *	<i>Escherichia coli</i> Tn5 transposon	neomycin phosphotransferase II enzyme	allows transformed plants to metabolize neomycin and kanamycin antibiotics during selection
aad *	<i>Escherichia coli</i>	3''(9)-O-aminoglycoside adenyltransferase enzyme	allows selection for resistance to aminoglycoside antibiotics such as spectinomycin and streptomycin

* : Selection Marker/Reporter

Utilisation des cotons résistants aux insectes limite l'utilisation des insecticides

Ex 2 Le riz doré ou Golden Rice

Activité 1 : Analyse de l'article Paine et al., 2005, Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content, Nature Biotechnology, 23, 482-487

Questions :

1- Dans la version 1 du riz doré, quels sont les gènes introduits dans le génome du riz? (nombre, noms, espèces d'origine) Quelle stratégie a été utilisée? Qu'a-t-on alors obtenu?

Deux gènes ont été introduits dans le génome du riz : le gène *Psy* codant pour une phytoène synthase, provenant du narcisse et le gène *crtl* codant pour une carotène désaturase, provenant d'une bactérie (*Erwinia uredovora*). Les gènes sont surexprimés chez le riz pour induire la production de caroténoïdes. Une concentration maximale de 1,6 µg/g de caroténoïdes a été obtenue chez le riz dorée, version 1.

2- Quel est l'objectif de cette nouvelle étude?

L'objectif est de tester l'efficacité de différents gènes *Psy*, provenant de différentes espèces, et d'identifier un gène plus efficace que celui du narcisse, car les résultats laissent à penser que c'est l'étape phytoène synthase qui est limitante.

3 – Le premier criblage des constructions se fait sur des cals transformés de maïs. Comment est évaluée l'efficacité du gène introduit pour augmenter la biosynthèse des caroténoïdes?

L'efficacité du gène est évaluée par la coloration jaune des cals cellulaires (Fig. 1b). Des mesures quantitatives de teneurs en caroténoïdes complètent ces observations visuelles (Fig. 1c).

4 – Les constructions sont ensuite introduites dans le riz. Quels sont les promoteurs qui contrôlent l'expression de gènes? Quel est le gène de sélection utilisé pour la transformation?

Les gènes *crtl* et *Psy* sont sous le contrôle du promoteur de glutéline du riz. C'est un promoteur qui contrôle l'expression des protéines de réserves dans le grain de riz, et donc la synthèse des caroténoïdes est ciblée spécifiquement dans les grains de riz. Le gène de sélection est le gène *hpt*, conférant la résistance à un antibiotique, l'hygromycine, sous le contrôle du promoteur polyubiquitine de maïs (Fig. 2a).

5 – Quel est le gène le plus efficace chez le riz? Quelle est l'amélioration observée par rapport à la première version du riz doré?

Les deux gènes les plus efficaces sont ceux provenant du riz et provenant du maïs (Fig.2b). C'est celui du maïs qui a été utilisé pour produire le riz doré version 2. Les auteurs obtiennent une augmentation de la teneur en caroténoïdes jusque 23 fois par rapport au riz doré 1.



See all events of crop:

Rice (*Oryza sativa* L.)

See all events developed by:

International Rice Research Institute

See all events with trait introduction method:

Agrobacterium tumefaciens-mediated plant transformation

See all events with commercial trait:

Modified Product Quality

See all events with GM trait:

Mannose metabolism
Enhanced Provitamin A Content

See all events with gene:

crt1
psy1
pmi

Lists

Crops List
Events List
Genes List
GM Traits List

Event Name: GR2E

Event Code : IR-00GR2E-5
Trade Name: Golden Rice

Crop: [Oryza sativa L. - Rice](#)

Basic Information | Authorizations | Documents and Links

Developer:
[International Rice Research Institute](#)

Method of Trait Introduction:
[Agrobacterium tumefaciens-mediated plant transformation](#)

GM Trait s :
[Mannose metabolism](#) , [Enhanced Provitamin A Content](#)

Commercial Trait:
[\(Singular\)](#) [Modified Product Quality](#)

Summary of Basic Genetic Modification

Gene Introduced	Gene Source	Product	Function
crt1	<i>Pantoea ananatis</i>	phytoene desaturase enzyme CRTI	catalyzes the conversion of 15-cis-phytoene to all-trans-lycopene
psy1	<i>Zea mays</i>	phytoene synthase ZmPSY1	converts geranylgeranyl diphosphate into phytoene, and acts upstream of CRTI in the carotenoid biosynthesis pathway
pmi *	<i>Escherichia coli</i>	Phosphomannose Isomerase (PMI) enzyme	metabolizes mannose and allows positive selection for recovery of transformed plants


* : Selection Marker/Reporter

Ex 3 Papaye résistante au Ringspot Virus (PRSV)


PRSV = Potyvirus transmis
par les pucerons

Résistance acquise par
expression constitutive
d'une protéine de
l'enveloppe virale / RNAi
silencing

[Contact | Purchase Publications >](#)



**INTERNATIONAL SERVICE
FOR THE ACQUISITION
OF AGRIBIOTECH
APPLICATIONS**



Join our
Crop Biotech Update
mailing list

ISAAA in Brief | ISAAA Programs | Knowledge Center | Biotech Information Resources | GM Approval Database | ISAAA Blog | Donate

/ ISAAA / GM Approval Database / GM Crop Events List / 55-1

See all events of crop:

Papaya (*Carica papaya*)

See all events developed by:

Cornell University and University of Hawaii

See all events with trait introduction method:

Microparticle bombardment of plant cells or tissue

See all events with commercial trait:

Disease Resistance

See all events with GM trait:

Viral disease resistance
Antibiotic resistance
Visual marker

See all events with gene:

prsv_cp
nptII
uidA

Lists

Crops List
Events List

Event Name: 55-1

Event Code : CUH-CP551-8
Trade Name: Rainbow, SunUp

Crop: [Carica papaya - Papaya](#)

Basic Information | Authorizations | Documents and Links

Developer:
[Cornell University and University of Hawaii](#)

Method of Trait Introduction:
[Microparticle bombardment of plant cells or tissue](#)

GM Traits :
[Viral disease resistance](#) , [Antibiotic resistance](#) , [Visual marker](#)

Commercial Trait:
[\(Singular\) Disease Resistance](#)

Summary of Basic Genetic Modification

Gene Introduced	Gene Source	Product	Function
prsv_cp	Papaya ringspot virus (PRSV)	coat protein (CP) of the papaya ringspot virus (PRSV)	confers resistance to papaya ringspot virus (PRSV) through "pathogen-derived resistance" mechanism
nptII *	<i>Escherichia coli</i> Tn5 transposon	neomycin phosphotransferase II enzyme	allows transformed plants to metabolize neomycin and kanamycin antibiotics during selection
uidA *	<i>Escherichia coli</i>	beta-D-glucuronidase (GUS) enzyme	produces blue stain on treated transformed tissue, which allows visual selection



Table 1 Fresh papaya fruit production (x 1,000 kg) in Hawaii and the Puna district from 1992 to 2004

Year	Hawaii production	Puna production	%
1992 ^a	25,340	24,073	95
1993	26,430	25,108	95
1994	25,522	25,215	99
1995	19,028	17,808	94
1996	17,166	15,529	90
1997	16,212	12,629	78
1998 ^b	16,167	12,148	75
1999	17,892	11,630	65
2000	22,820	15,417	68
2001	23,614	18,297	77
2002	19,391	16,294	84
2003	18,528	16,228	88
2004	15,533	13,737	88

^aOutbreak of PRSV in Puna.

^bSeed release of PRSV-resistant transgenic papaya.

Figure 2

(a) Destruction caused by PRSV in a commercial papaya orchard in Puna in 1994. (b) PRSV-infected nontransgenic papaya (*left*) and healthy transgenic Rainbow papaya (*right*) in a field trial in Puna in 1995. (c) Aerial view of a solid block of healthy transgenic Rainbow papaya surrounded by rows of PRSV-infected nontransgenic papaya in a field trial in Puna in 1995. (d) Reclamation of land by transgenic papaya (*front*). Note the dark-green healthy Rainbow papaya (*back*) growing between abandoned PRSV-infected papaya orchards. (e) A field of healthy commercial transgenic Rainbow in 1999, only one year after releasing transgenic seeds to the Hawaii papaya industry. (f) Transgenic Rainbow papaya fruits sold in a supermarket. (g) Transgenic Rainbow papaya (*right*) growing next to nontransgenic Kapoho papaya (*left*) under an identity preservation protocol. Note the close proximity of nontransgenic and transgenic trees. (h) Healthy transgenic Rainbow papaya field (*back*) next to PRSV-infected nontransgenic Kapoho (*front*) that was cut down before harvest.

Références

Sites de référence

<https://www.isaaa.org/>

ISAAA = ISAAA is a not-for-profit international organization that shares the benefits of new bioscience technologies to key stakeholders, particularly resource-poor farmers in developing countries, through knowledge sharing, support to capacity building initiatives, and partnerships. Base de données sur les PGM

<https://www.gnis-pedagogie.org/> GNIS = interprofession semences et plants. Nouveau nom = SEMAE.

Articles de recherche

Bevan MW, Flavell RB, Chilton M-D. 1983. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304:184–87

Bilas R et al., 2016. Cis-regulatory elements used to control gene expression in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127, 269 -287

Chilton M-D, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, et al. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11:263–71

Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, et al. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803–7

Herrera-Estrella L, Depicker A, Van Montagu M, Schell J. 1983. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303:209–13

Lowe K et al., 2016. Morphogenic Regulators Baby boom and Wuschel Improve Monocot Transformation. *The Plant Cell*, 28 (9) 1998-2015; DOI: 10.1105/tpc.16.00124

Paine, J., Shipton, C., Chaggar, S. et al. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nat Biotechnol* 23, 482–487 (2005). <https://doi.org/10.1038/nbt1082>

Articles de revue

Chen K, Wang Y, Zhang R, Zhang H, Gao C. 2019. CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2019. 70:667–97. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100049>

Lacroix B, Citovsky V. 2019. Pathways of DNA Transfer to Plants from *Agrobacterium tumefaciens* and Related Bacterial Species. *Annual Review of Phytopathology* 2019 57:1, 231-251

Plan du cours

Introduction

Définitions

Place de ces techniques en amélioration des plantes

Chiffres-clés marché mondial

Partie I. Transgénèse

I.A. Méthodes de production de plantes transgéniques

I.B. Exemples d'applications

I.C. Avantages / Limites technologiques

Partie II. Edition du génome

II.A. Méthodes de production de plantes éditées

II.B. Exemples d'applications

II.C. Développements technologiques actuels

Partie III. Réglementations / Débat sociétal

Conclusion générale

**Avantages / amélioration des plantes
« classique »**

Limites

Permet de créer de la variabilité génétique / des mécanismes de résistance qui n'existent pas forcément dans la nature

Toutes les espèces / tous les génotypes au sein d'une espèce ne sont pas susceptibles d'être transformés

Permet d'exprimer des gènes provenant d'organismes différents, avec lesquels des croisements ne sont pas possibles

En plus du gène d'intérêt, les plantes conservent bien souvent le gène de sélection (résistance à un antibiotique)

Permet d'accélérer le processus de sélection – en général -

Insertion du transgène se fait de façon non contrôlée

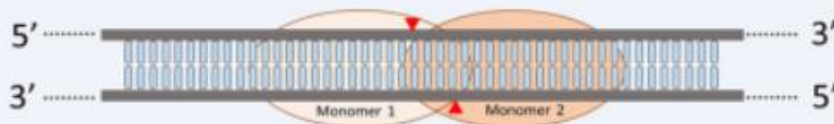
II.A. Méthodes de production de plantes éditées

L'édition des génomes est basée sur l'utilisation de nucléases site-spécifiques

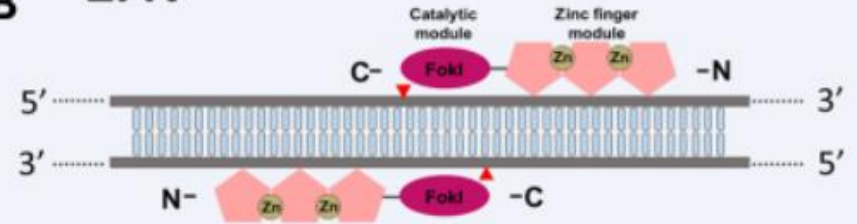
Ces nucléases reconnaissent une séquence spécifique d'ADN

A ->D : système de plus en plus flexible, modulaire

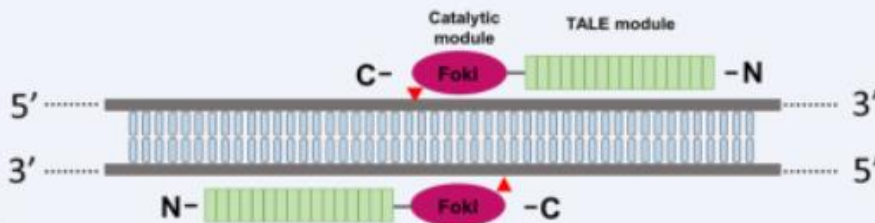
A Meganuclease



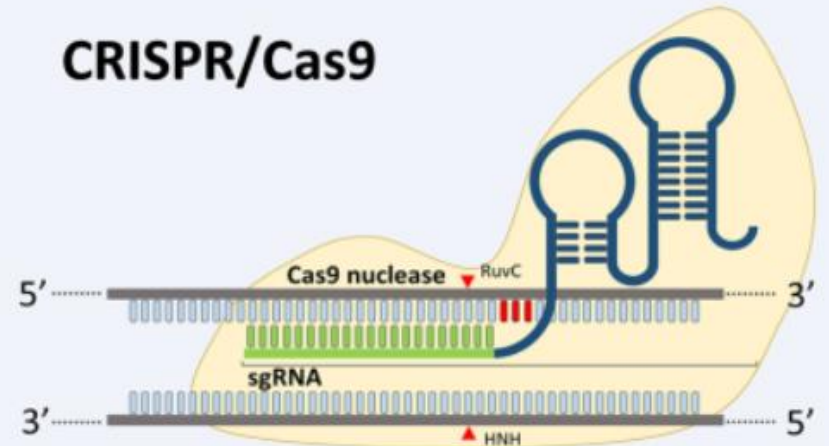
B ZFN



C TALEN



D CRISPR/Cas9



FokI = endonucléase

ZFN = Zinc Finger Nuclease

TALEN = Transcription activator-like effector nuclease

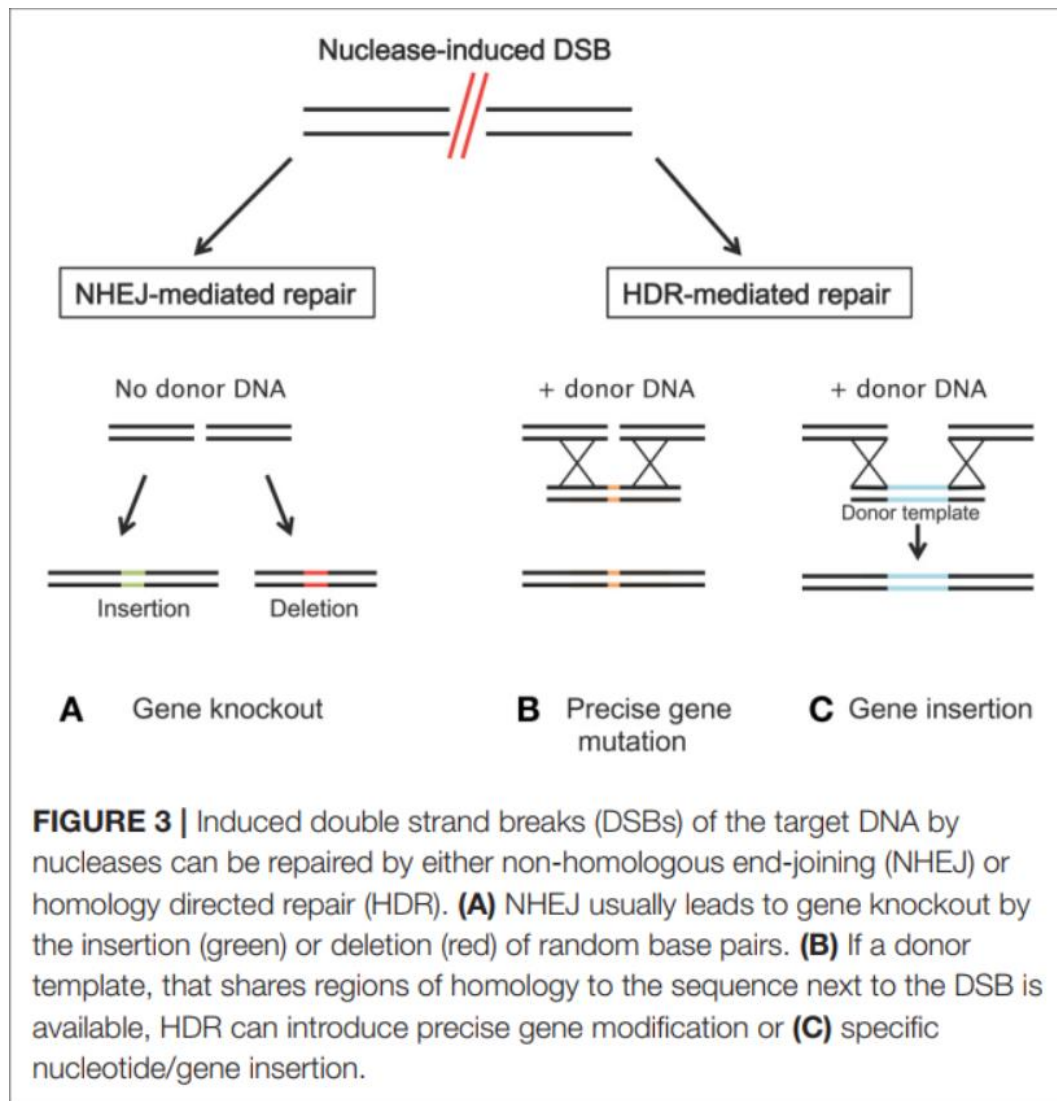
RuvC, HNN = 2 domaines nucléases

FIGURE 1 | Schematic diagram depicting four Genome Editing Systems (GES) to target DNA. (A) Homodimers structure of a meganuclease system. **(B)** Zinc finger nuclease (ZFN) showing two monomers bound to DNA. The ZFN contains a catalytic FokI domain (ellipse in pink) and a zinc finger DNA-binding domain (DBD) (pentagons in rose). **(C)** Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) showing two monomers bound to DNA. Like ZFN, TALEN comprises a catalytic FokI domain (ellipse in pink). Light green rectangles represent the DNA bind domain containing the repeat variable di-residue (RVD) arrays of amino acids to recognize DNA specific sequences. **(D)** Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) CRISPR-associated protein 9 (Cas9) (CRISPR/Cas9). Typically CRISPR/Cas9 system comprises a Cas9 protein (depicted in light gold) with two nuclease domains, referred as HuvC and HNH, and a chimeric single guide RNA (sgRNA). The sgRNA consists of a CRISPR RNA (crRNA, 21 nucleotides in light green) to direct the Cas9 protein to the complementary sequences of the DNA target and a *trans*-activating crRNA (RNA sequence represented in dark blue) involved in the processing of pre-crRNA into a mature crRNA. Arrowheads in red indicate cleave sites to each GES.

Les nucléases font des **cassures double-brins de l'ADN** et les processus de réparation de l'ADN, qui sont source d'erreurs, entraînent la **modification du génome**

Réparation par jonction des extrémités de façon non homologue ou par microhomologie : peut entraîner des délétions ou des insertions de quelques bases

Si réparation sans erreur, la nucléase peut à nouveau couper...



Recombinaison homologue, malheureusement très peu efficace chez les plantes

Site-Directed Nucleases



	Meganuclease	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas
Nb of proteins required	1	2	2	1 + gRNA
Off-target	Low (target = 18-24 bp)	Medium high (target = 2 x 12-18 bp)	Low (target = 2 x 10-30 bp)	Medium low (target = 19-23 bp)
Diversity of target sequences	One cutting site every 250 bp	One cutting site every 500 bp	One cutting site every 35 bp	One cutting site every 8 pb
Difficulty of production	Heavy (modification of the peptid chain and selection)	Uneasy (interaction effects on specificity)	Relatively easy (modular assembly)	Very easy (synthesis of one oligonucleotid)
Approximate price	50 000 €	5000 €	1000 €	20 €

Système CRISPR-Cas9 = endonucléases **ARN-guidées**

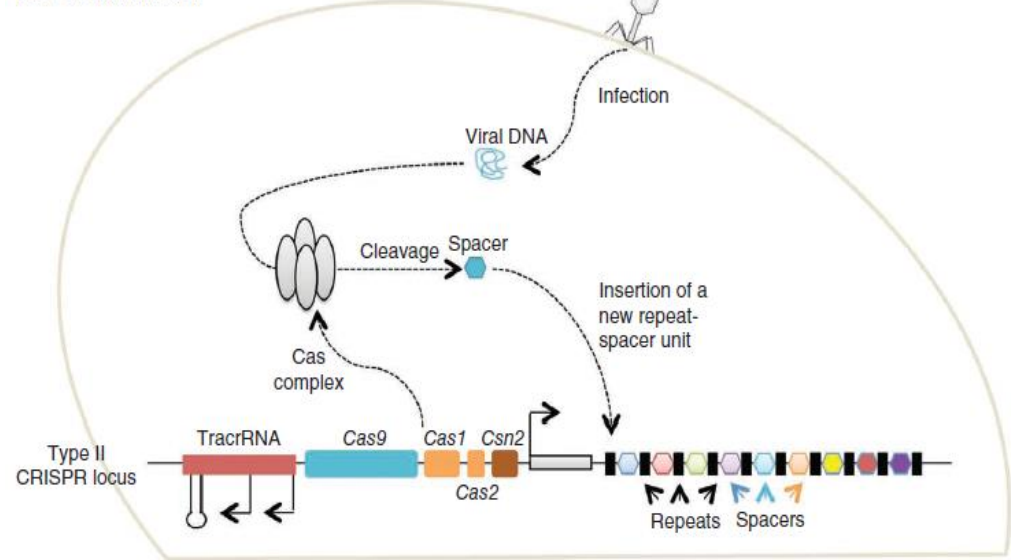
CRISPR = Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Cas = CRISPR associated protein

Provient du **système immunitaire bactérien** pour se défendre de l'ADN viral exogène

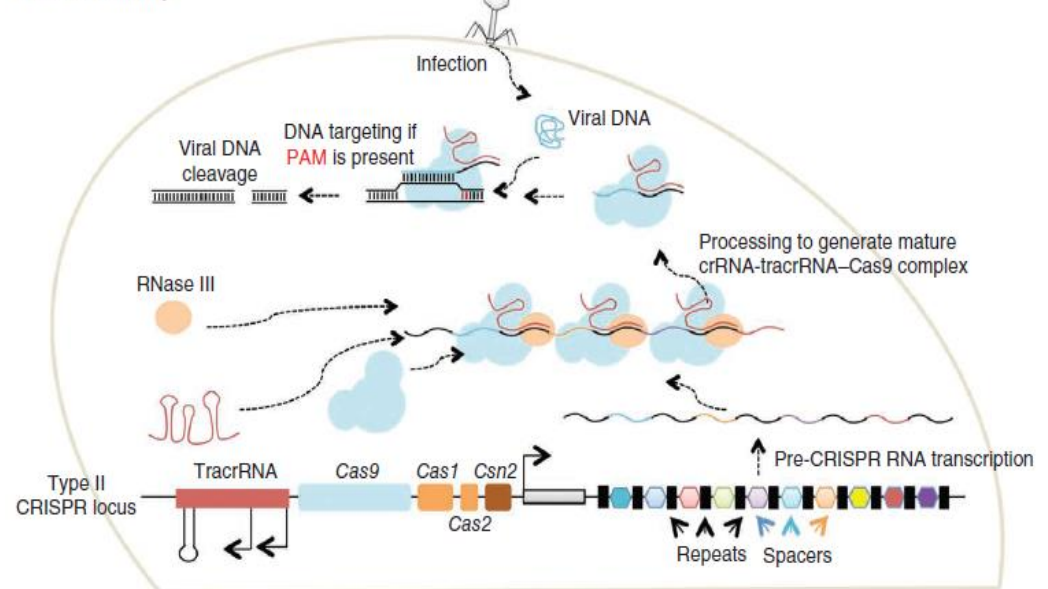
Bactériophage = virus bactérien

Phase 1: immunization



Spacer : fragment d'ADN viral de 20 pb

Phase 2: immunity



Mali et al, 2013

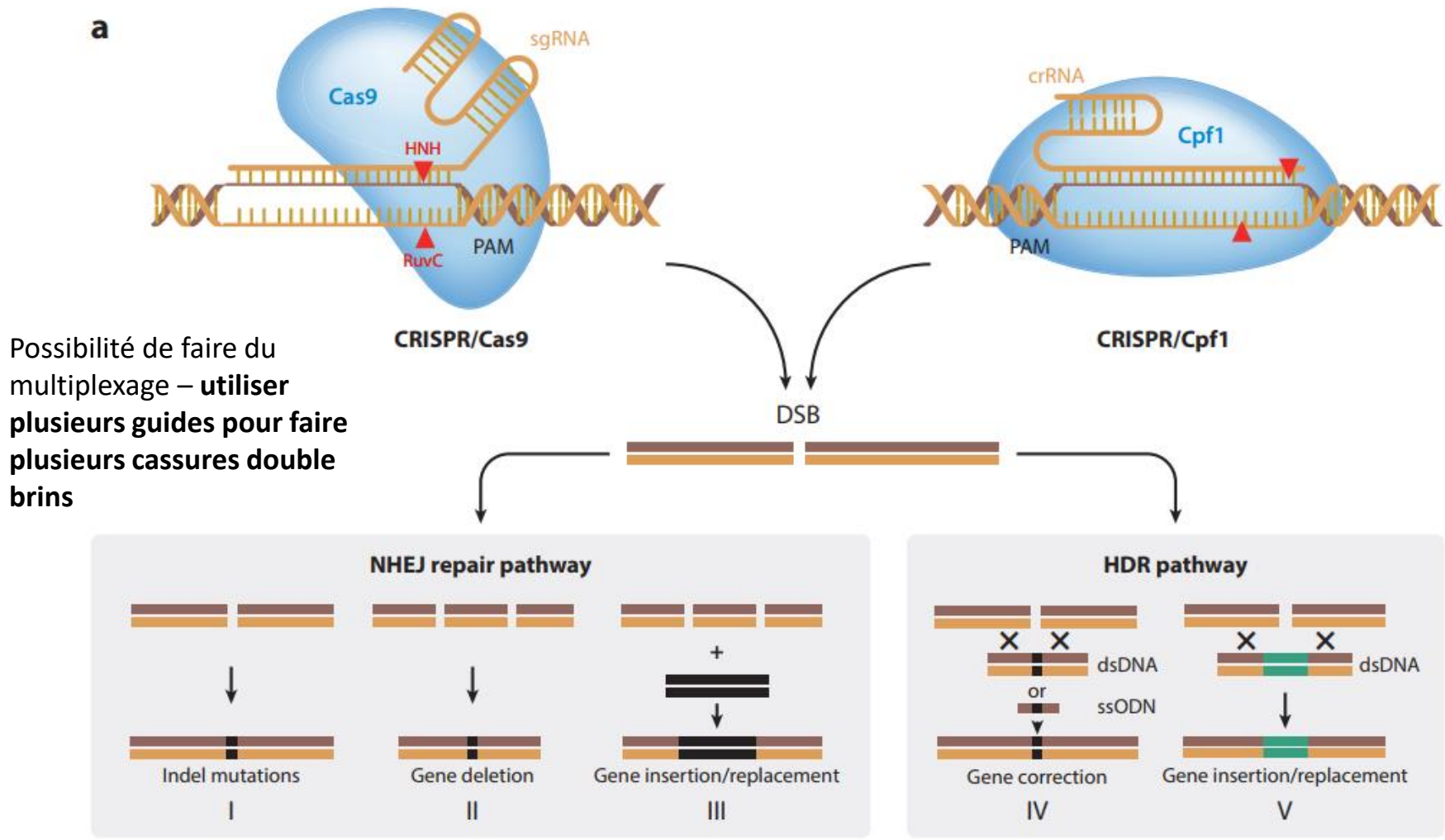


Figure 2 (Figure appears on preceding page)

CRISPR/Cas systems for genome editing and other manipulations. (a) Two CRISPR/Cas systems used for plant genome engineering: Cas9 and Cpf1. (b) Genome editing with CRISPR/Cas systems can have multiple outcomes, depending on the DSB repair pathways: I, II, and III are outcomes of the dominant NHEJ repair pathway; IV and V are outcomes of the HDR pathway using an available DNA donor template. (c) Overview of various applications of dCas9 fusion-based genome manipulations. dCas9 fused with other proteins

Edition de base en utilisant une nCas9 (nickase / coupure ADN simple brin) fusionnée à une cytidine ou adenosine deaminase

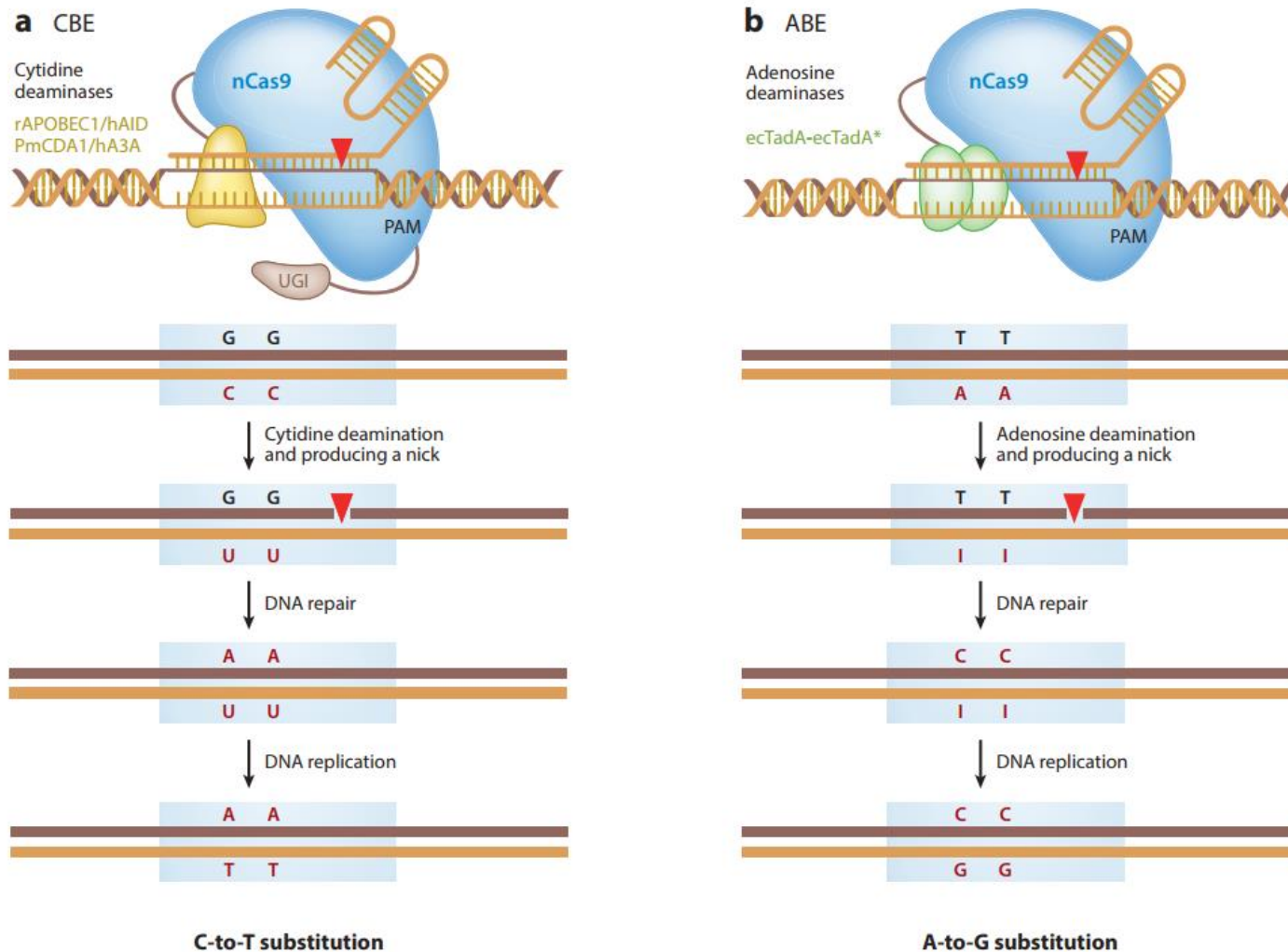
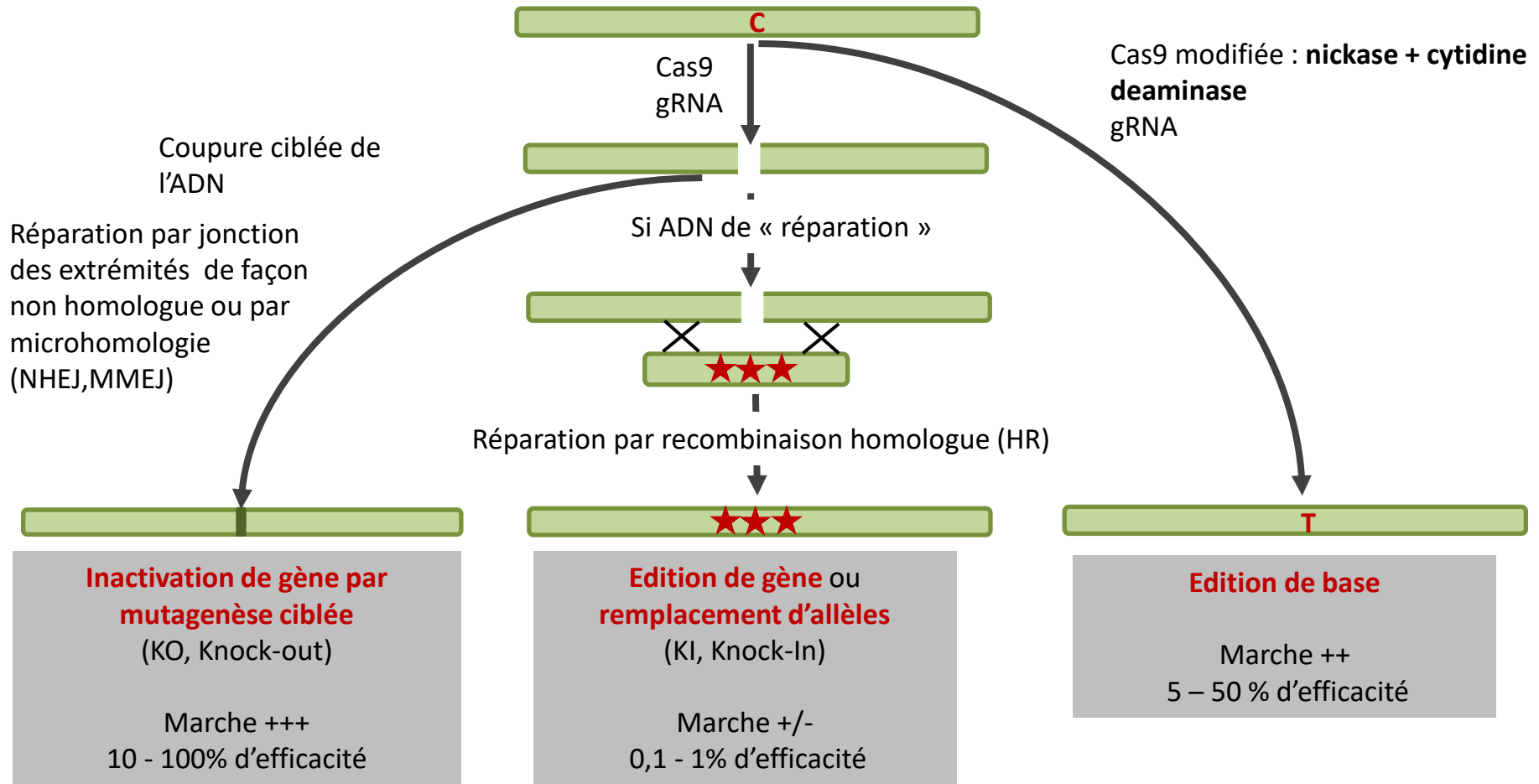


Figure 3

Mechanisms of base editing. (a) CBE-mediated C-to-T base-editing strategy. The deaminases include rAPOBEC1, hAID, PmCDA1, and hA3A. (b) ABE-mediated A-to-G base-editing strategy. The deaminase is the fusion protein ecTadA-ecTadA*. Abbreviations: ABE, adenine base editor; CBE, cytosine base editor; hAID, human activation-induced cytidine deaminase; nCas9, a DNA nickase; PAM, protospacer-adjacent motif; UGI, uracil glycosylase inhibitor.

Edition du génome chez les plantes :



Inactivation de gène par
mutagenèse ciblée (KO)

Edition de gène ou
remplacement d'allèles ou KI

T
Edition de base

Outil en constante évolution, avec des enzymes présentant des spécificités différentes au niveau du PAM

- 20bp-NGG - Sp Cas9, SpCas9-HF1, eSpCas9 1.1
- 20bp-NGG - Sp Cas9, SpCas9-HF1, eSpCas9 1.1
- 20bp-NGG - Cas9 S. canis
- 20bp-NGGT - Cas9 S. canis - high efficiency PAM, recommended
- 20bp-NAA - iSpyMacCas9
- 21bp-NNG(A/G)(A/G)T - Cas9 S. Aureus
- 20bp-NNG(A/G)(A/G)T - Cas9 S. Aureus with 20bp-guides
- 20bp-NG(G/T) - xCas9, high efficiency PAM, recommended
- 20bp-NGN or GA(A/T) - xCas9, low efficiency PAM
- 21bp-NNN(A/G)(A/G)T - KKH SaCas9
- 20bp-NNN(A/G)(A/G)T - KKH SaCas9 with 20bp-guides
- 20bp-NGA - Cas9 S. Pyogenes mutant VQR
- 24bp-NNNNCC - Nme2Cas9, NEW! 2019, A. Edraki
- 20bp-NGCG - Cas9 S. Pyogenes mutant VRER
- 20bp-NNAGAA - Cas9 S. Thermophilus
- 20bp-NGGNG - Cas9 S. Thermophilus
- 20bp-NNNNG(A/C)TT - Cas9 N. Meningitidis
- 20bp-NNNNACA - Cas9 Campylobacter jejuni
- TTT(A/C/G)-23bp - Cas12a (Cpf1) Acidaminoc. / Lachnosp. - recommended
- TTTN-23bp - Cas12a (Cpf1) Acidaminoc. / Lachnosp - low efficiency

[\(crispor.tefor.net/\)](http://crispor.tefor.net/)

Cytidine déaminase : C modifié en T
Adénine déaminase : A modifié en G

Possibilité de faire du **multiplexage** : plusieurs gRNA, donc plusieurs cibles en même temps

Pour faire un KO – gene knock-out (mutation dans un gène) : 2 guides espacés d'une 50taine de pb pour faire une délétion de cette taille et inactiver le gène.

A terme, toutes les modifications vont devenir possible!!

Bien choisir la séquence cible pour éviter les problèmes d'**off-targets**

Production des plantes éditées en utilisant des protocoles issus de la transgénèse

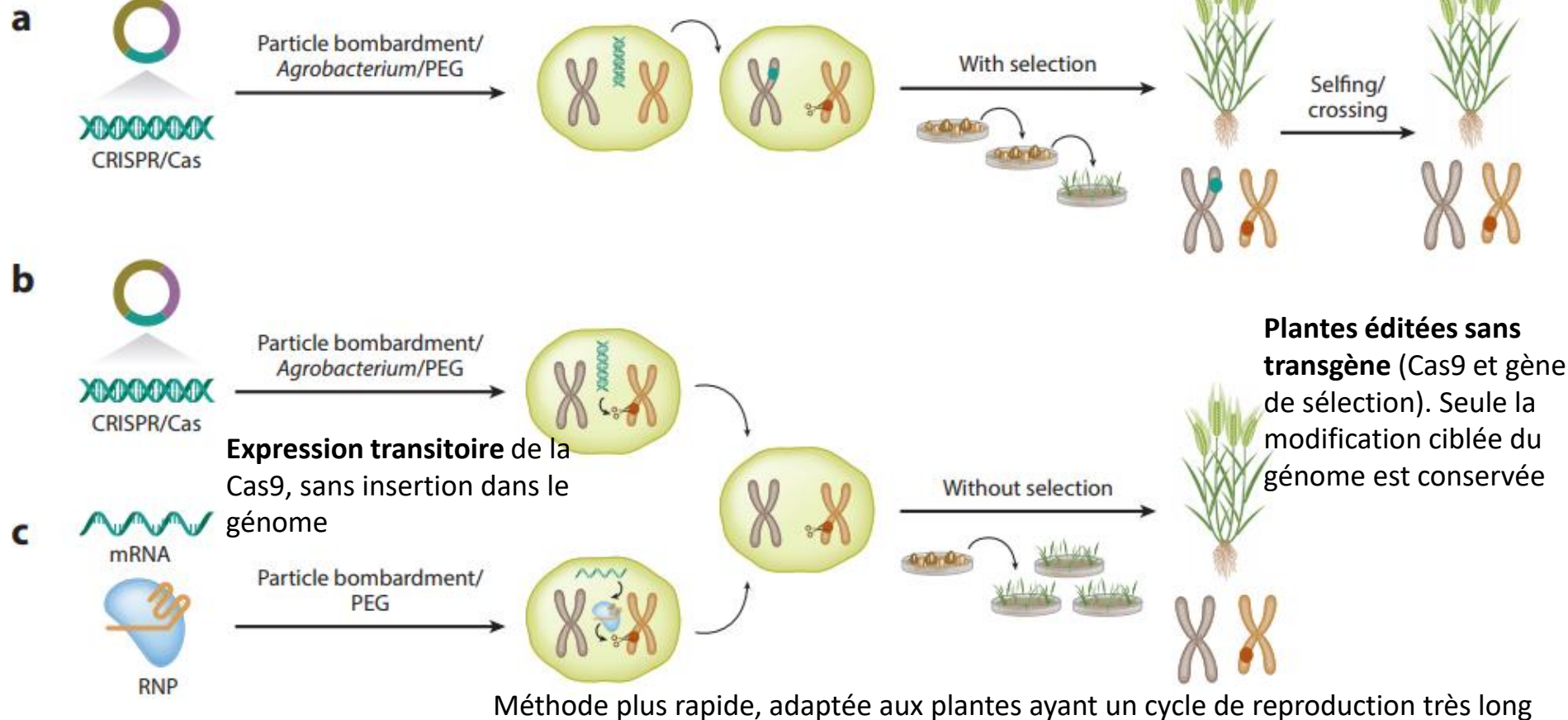


Figure 4

Delivery strategies for CRISPR/Cas systems to plants. (a) Traditional delivery methods for CRISPR/Cas DNA combined with herbicide or antibiotic selection. Transgene-free plants can be obtained through genetic segregation by selfing and crossing. (b,c) Transient delivery systems for transgene-free and DNA-free genome editing. CRISPR reagents include DNA, mRNA, and RNP. After transient expression, CRISPR/Cas DNA, mRNA, or RNP will be degraded, and the edited plants can be regenerated without selection pressure. Abbreviations: mRNA, messenger RNA; PEG, polyethylene glycol; RNP, ribonucleoprotein.

II.B. Exemples d'applications

TABLE 1 | Application of genome editing tools in different plant species to improve yield, biotic, and abiotic stress resistance, and nutritional quality.

Target trait	Plant species	Targeted sequence(s)	Results	Method	Reference	
Yield	<i>Oryza sativa</i>	GS3, Gn1a	Grain size and number increase	CRISPR/Cas9	Shen et al., 2018a	
	<i>Oryza sativa</i>	GW2, GW5, TGW6	Grain weight increase	CRISPR/Cas9	Xu et al., 2016	
	<i>Oryza sativa</i>	Gn1a, DEP1, GS3	Grain size and number increase and dense, erect panicles	CRISPR/Cas9	Li M. et al., 2016	
Virus resistance	<i>Arabidopsis thaliana</i>	eIF(iso)4E	Potyvirus resistance	CRISPR/Cas9	Pyott et al., 2016	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BSCTV genome	Beet severe curly top virus resistance	CRISPR/Cas9	Ji et al., 2015	
	<i>Cucumis sativus</i>	eIF4E ¹	Cucumber vein yellowing virus, zucchini yellow mosaic virus, and papaya ring spot mosaic virus-W resistance	CRISPR/Cas9	Chandrasekaran et al., 2016	
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	BSCTV genome	Beet severe curly top virus resistance	CRISPR/Cas9	Ji et al., 2015	
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	TYLCV genome	Tomato yellow leaf curl virus resistance	CRISPR/Cas9	All et al., 2015a	
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	AGO2	Virus resistance	CRISPR/Cas9	Ludman et al., 2017	
Fungus resistance	<i>Oryza sativa</i>	OsERF922	Rice blast resistance	CRISPR/Cas9	Wang et al., 2016	
	<i>Solanum lycopersicum</i>	SlMlo	Powdery mildew resistance	CRISPR/Cas9	Nekrasov et al., 2017	
	<i>Triticum aestivum</i>	TaMLO-A1	Powdery mildew resistance	CRISPR/Cas9 TALEN	Wang et al., 2014	
Bacterial resistance	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck	CsLOB1	Canker resistance	CRISPR/Cas9	Peng et al., 2017	
	<i>Oryza sativa</i>	OsSWEET13	Bacterial blight resistance	CRISPR/Cas9	Zhou et al., 2015	
	<i>Oryza sativa</i>	Os11N3 (OsSWEET14)	Bacterial blight resistance	TALEN	Li T. et al., 2012	
Drought tolerance	<i>Arabidopsis</i>	mir169a	Improved drought tolerance	CRISPR/Cas9	Zhao et al., 2016	
	<i>Zea mays</i>	ARGOS8	Improved grain yield under field drought stress conditions	CRISPR/Cas9	Shi et al., 2017	
Salt tolerance	<i>Oryza sativa</i>	OsRAV2	Salt stress tolerance	CRISPR/Cas9	Duan et al., 2016	
Herbicide tolerance	<i>Linum usitatissimum</i>	EPSPS	Glyphosate tolerance	CRISPR/Cas9	Sauer et al., 2016	
	<i>Nicotiana tabacum</i>	MEL1	Herbicide tolerance	ZFN	Cai et al., 2009	
	<i>Nicotiana tabacum</i>	ALS	Resistance to imidazolinone and sulfonylurea herbicides	TALEN	Zhang et al., 2013	
	<i>Oryza sativa</i>	ALS	Chlorsulfuron and bispyribac sodium tolerance	CRISPR/Cas9	Sun et al., 2016	
	<i>Oryza sativa</i>	EPSPS	Glyphosate tolerance	CRISPR/Cas9	Li J. et al., 2016	
	<i>Solanum tuberosum</i>	ALS1	Chlorsulfuron and bispyribac sodium tolerance	CRISPR/Cas9	Butler et al., 2016	
	<i>Zea mays</i>	IPK1	Herbicide tolerance	ZFN	Shukla et al., 2009	
	Nutritional improvement	<i>Camelina sativa</i>	FAD2	Enhancement of seed oil	CRISPR/Cas9	Jiang et al., 2017
		<i>Oryza sativa</i>	SBEI, SBEIb	High amylose content	CRISPR/Cas9	Sun et al., 2017
<i>Oryza sativa</i>		OsBADH2 ²	Increased fragrance content	TALEN	Shan et al., 2015	
<i>Solanum tuberosum</i>		GBSS	High-amylopectin starch	CRISPR/Cas9	Andersson et al., 2017	
<i>Zea mays</i>		ZmIPK	Reduced phytic acid content	CRISPR/Cas9 TALEN	Liang et al., 2014	

¹eIF4E, eukaryotic translation initiation factor 4E. ²BADH, betaine aldehyde dehydrogenase.

Activité 2 : Analyse de l'article Nekrasov et al., 2017. Rapid generation of a transgene free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. Scientific Reports, 7: 482 | DOI:10.1038/s41598-017-00578-x

L'objectif de ce travail est d'obtenir des tomates résistantes à l'oïdium, maladie due à un champignon (*Oidium neolycopersici*) en utilisant la technologie CRISPR/Cas9.

Quelques informations pour aider à la compréhension:

Loss-of-function mutation = mutation rendant le gène inactif (KO)

Primary transformants (T0) = transformants issus directement de l'expérience de transformation

Transformants T1 = transformants issus de l'autofécondation des T0

Notation : *GeneX* : forme dominante du gène / *geneX* : forme mutante

PCR = polymerase chain reaction : permet d'amplifier spécifiquement un fragment d'ADN à l'aide d'amorces (primers) spécifiques de cette séquence.

- 1) Quel est le gène ciblé par la modification ciblée du génome? Pour quel type de protéine code-t-il? Pourquoi ce gène a-t-il été choisi?
- 2) Quelle est la stratégie utilisée (texte et Figure 1)?
- 3) Comment a été mise évidence la modification du génome obtenue (Figure 1)?
- 4) Comment obtient-on des tomates sans transgène (sans T-DNA)?
- 5) Quel est le phénotype des plantes éditées (résistance à l'oïdium, rendement en tomates)?

Quel est le gène ciblé par la modification ciblée du génome? Pour quel type de protéine code-t-il? Pourquoi ce gène a-t-il été choisi?

Le gène ciblé est le gène *SlMlo1* (Sl = *Solanum lycopersicum* = nom latin de la tomate; *Mlo* = MILDEW RESISTANT LOCUS O = gène de sensibilité à l'oïdium, 1 = gène n°1 parmi les 16 gènes de sensibilité chez la tomate). Le gène code pour une protéine membranaire, présentant 7 domaines trans-membranaires, conserve chez les Monocotylédones et les Dicotylédones et qui confèrent une sensibilité des plantes aux champignons responsables de l'oïdium. Ce gène a été choisi car c'est celui qui contribue le plus à la sensibilité des tomates. De plus, il existe des mutants naturels *slmlo1* qui ont montré une résistance accrue à l'oïdium.

Quelle est la stratégie utilisée (texte et Figure 1)?

La stratégie est de faire une mutation KO du gène en utilisant deux single guide RNA ciblant le gène *SlMlo1* et séparés de 48 paires de bases.

Comment a été mise évidence la modification du génome obtenue (Figure 1)?

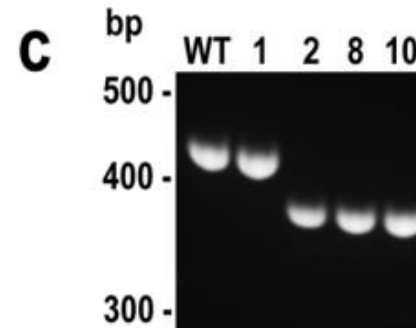
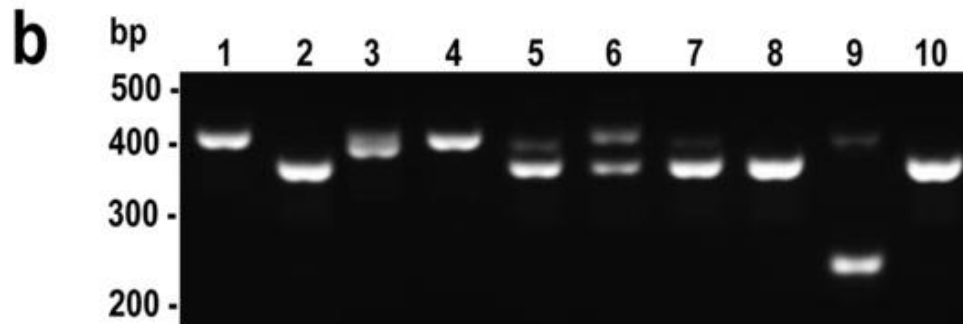
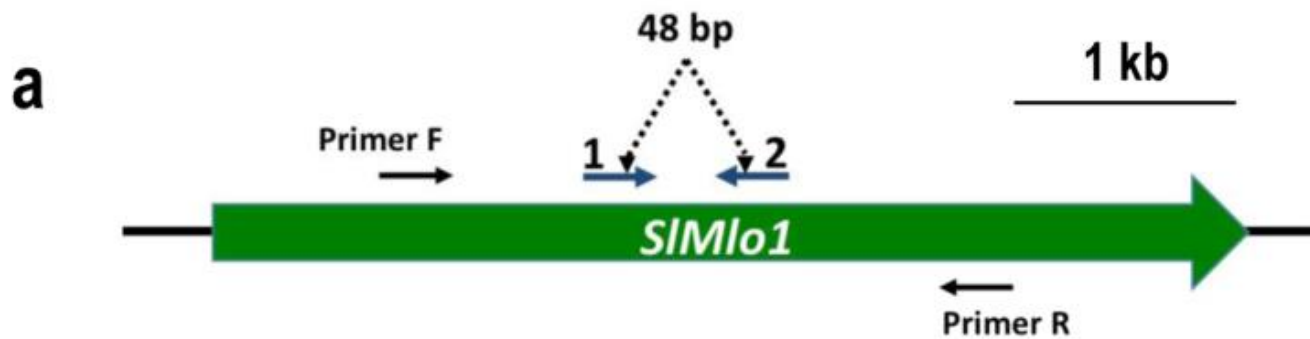
En utilisant des amorces encadrant le site d'édition, un fragment d'ADN a été amplifié par PCR et migré par électrophorèse. La différence de taille de bandes entre individus différents suggère qu'il y a eu une délétion d'environ 50 pb pour certains (band shift assay). Par séquençage, la délétion a été effectivement confirmée chez les individus 2, 8 et 10.

Comment obtient-on des tomates sans transgène (sans T-DNA)?

Le transformant primaire (T0) n°8 a été autofécondé. Dans la descendance (T1) ont été identifiés 5 individus ne portant pas de T-DNA dans leur génome : cela a été vérifié par PCR en utilisant des amorces ciblant le gène de la Cas9 (Fig. 1f).

Quel est le phénotype des plantes éditées (résistance à l'oïdium, rendement en tomates)?

Les mutants *slmlo1* sont résistants à l'oïdium (Fig. 1e) et présentent un rendement en tomates équivalent aux plantes sauvages.



d

	Target 1	PAM	PAM	Target 2	
WT	ACATAGTAAAAAGGTGTACCTGTGGTGGAGAC	TGGTGACCATCTTTTCTGGT	TTAATCGCCCTGCCCTTGTCCCT	ATTCTTGATTAACCTTGTACTCTTTCAGG	
Plant 1	ACATAGTAAAAAGGTGTACCTGTGGTGGAGAC	TGGTGACCATCTTTTCTGGT	TTAATCGCCCTGCCCTTGTCCCT	ATTCTTGATTAACCTTGTACTCTTTCAGG	
Plant 2	ACATAGTAAAAAGGTGTACCTGTGGTGGGA			CTTGATTAACCTTGTACTCTTTCAGG	-48
Plant 8	ACATAGTAAAAAGGTGTACCTGTGGTGGGA			CTTGATTAACCTTGTACTCTTTCAGG	-48
Plant 10	ACATAGTAAAAAGGTGTACCTGTGGTGGGA			CTTGATTAACCTTGTACTCTTTCAGG	-48
	ACATAGTAAAAAGGTGTACCTGTGGTGGGA			TTGATTAACCTTGTACTCTTTCAGG	-49

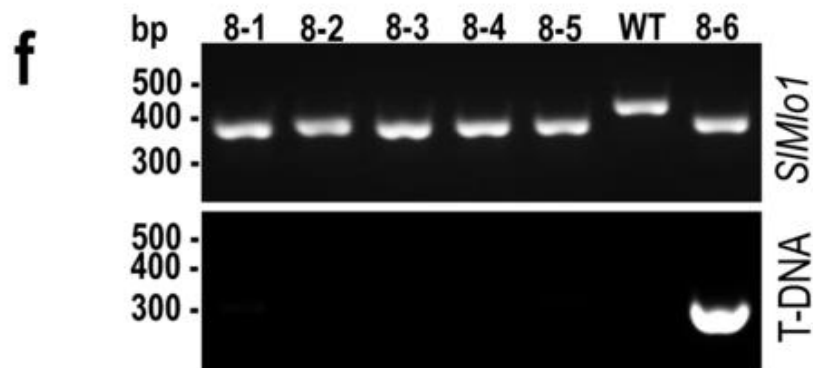


Figure 1. Generating non-transgenic *slmlo1* tomato lines resistant to powdery mildew. (a) The *SIMlo1* locus was targeted by two sgRNAs; (b) T0 tomato transformants were tested for the presence of deletions using the PCR band shift assay; (c) Selected T0 transformants genotyped using the PCR band shift assay alongside wild type (WT); (d) *SIMlo1* sequencing reads from selected T0 transformants; (e) Leaves of tomato plants inoculated with *Oidium neolycopersici* (5 weeks post inoculation); (f) PCR genotyping of the T1 generation for the presence T-DNA and the *slmlo1* mutation. The agarose gels presented in panels (b and c) were cropped.

Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9

Susana Sánchez-León^{1, #}, Javier Gil-Humanes^{2, *, #}, Carmen V. Ozuna¹, María J. Giménez¹, Carolina Sousa³, Daniel F. Voytas² and Francisco Barro^{1, *}

¹Departamento de Mejora Genética Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Córdoba, Spain

²Department of Genetics, Cell Biology, and Development, Center for Genome Engineering, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA

³Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

Received 28 May 2017;

revised 1 August 2017;

accepted 26 August 2017.

*Correspondence (Tel +34957499240; fax +34957499252; email fbarro@ias.csic.es (F.B.)) or (Tel +1 (651) 334 9384; email javi-gil@hotmail.com (J.G.H.))

[#]These authors contributed equally to this work.

Keywords: coeliac disease, α -gliadins, CRISPR/Cas9.

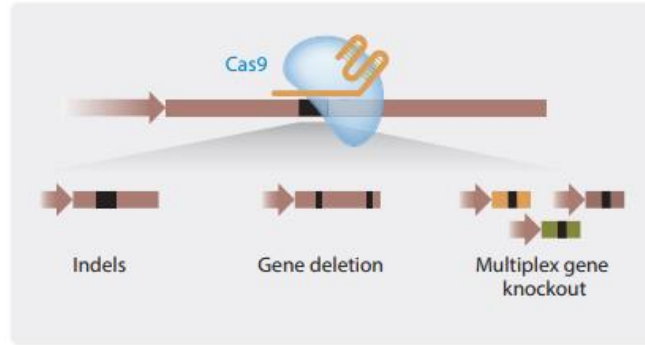
Summary

Coeliac disease is an autoimmune disorder triggered in genetically predisposed individuals by the ingestion of gluten proteins from wheat, barley and rye. The α -gliadin gene family of wheat contains four highly stimulatory peptides, of which the 33-mer is the main immunodominant peptide in patients with coeliac. We designed two sgRNAs to target a conserved region adjacent to the coding sequence for the 33-mer in the α -gliadin genes. Twenty-one mutant lines were generated, all showing strong reduction in α -gliadins. Up to 35 different genes were mutated in one of the lines of the 45 different genes identified in the wild type, while immunoreactivity was reduced by 85%. Transgene-free lines were identified, and no off-target mutations have been detected in any of the potential targets. The low-gluten, transgene-free wheat lines described here could be used to produce low-gluten foodstuff and serve as source material to introgress this trait into elite wheat varieties.

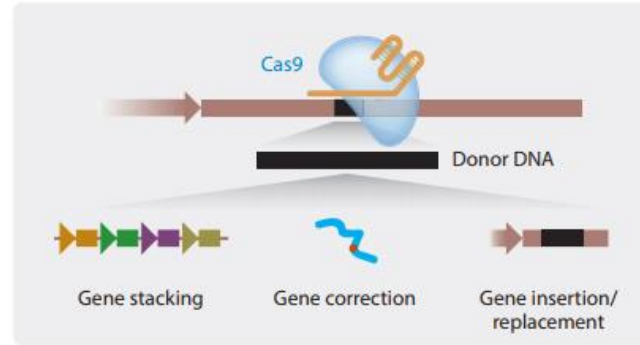
II.C. Développements technologiques actuels

Développements actuels et futurs

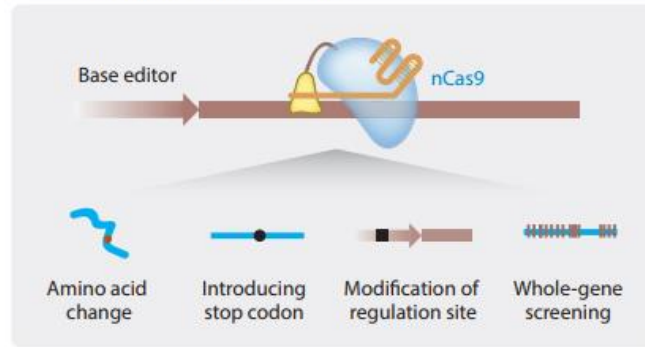
a Gene knockout



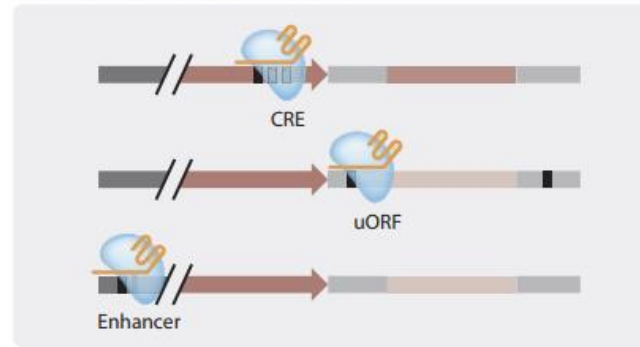
b Gene knock-in/replacement



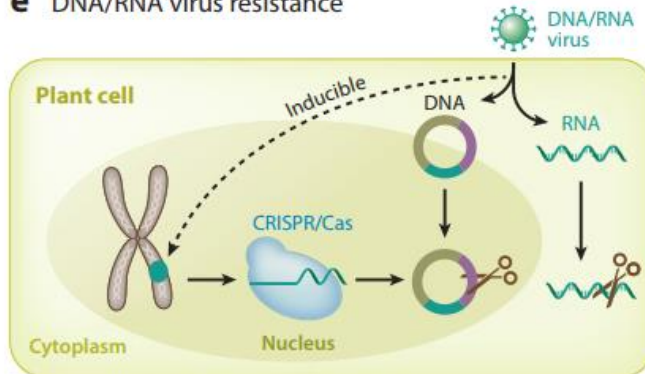
c Applications of base editing



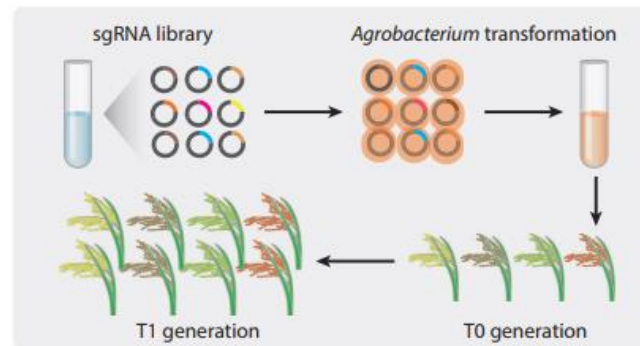
d Fine-tuning gene regulation



e DNA/RNA virus resistance



f High-throughput mutant library



Chen et al., 2019

Figure 5




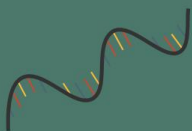





Overview of potential CRISPR/Cas-based applications for plant breeding. CRISPR/Cas-mediated crop trait improvement mainly focuses on yield, quality, and biotic and abiotic resistance. (a) CRISPR/Cas-mediated mutation can achieve indels, gene deletions, and multiplex gene knockout. (b) Gene insertion and replacement mediated by either homology-directed repair or nonhomologous end joining can achieve gene stacking for multiple traits, gene correction for gain-of-function, and gene insertion or replacement to produce new traits in breeding. (c) Applications of base editing for crop trait improvement, such as precise amino acid substitution, gene disruption by introducing a stop codon, gene regulation, and whole-gene screening. (d) CRISPR/Cas system-based gene regulation by editing the regulatory site in the untranslated region, promoter, or enhancer region. (e) CRISPR/Cas-based antiviral breeding strategies. The CRISPR system with a guide RNA targeting DNA or RNA viruses is integrated into the plant genome, conferring resistance to invading viruses. (f) CRISPR/Cas-based genome-wide screening, a valuable technique for functional genomics and genetic improvement. Abbreviations: CRE, *cis*-regulatory element; sgRNA, single guide RNA; uORF, upstream open reading frame.

III. Réglementation / Débat sociétal

Plantes transgéniques dont le génome porte un transgène (gènes(s) d'intérêt + gène de sélection, facilement détectable par PCR

Plantes éditées sans transgène, non différenciables de mutants naturels ou obtenus par mutagenèse chimique

How Crops are Genetically Modified

Traditional Breeding	Mutagenesis	RNA Interference	Transgenics	Gene Editing
<p>Crossing plants and selecting offspring</p>  <p>Desired gene(s) inserted with other genetic material</p> <p>Almost all crops</p>	<p>Exposing seeds to chemicals or radiation</p>  <p>Random changes in genome, usually unpredictable</p> 	<p>Switching off selected genes with RNA</p>  <p>Targeted gene(s) switched off or 'silenced'</p> 	<p>Inserting selected genes using recombinant DNA methods</p>  <p>Only gene(s) inserted at desired locations selected</p> 	<p>When used to delete genes using engineered nucleases (CRISPR, TALENs, ZFNs, etc.)</p>  <p>Desired gene(s) deleted only at known locations</p> 
<p>Number of genes affected: few genes to whole genomes</p>	<p>100s - 1,000s</p>	<p>1 - dozens</p>	<p>1 - 8</p>	<p>1 or more</p>
<p>No safety testing required; Unregulated</p>	<p>No safety testing required; Unregulated</p>	<p>Safety testing required; Highly regulated</p>	<p>Safety testing required; Highly regulated</p>	<p>Safety testing required depending on jurisdiction; Mixed regulations</p>
<p>Undesirable, unintended effects rarely occur in the final product of any crop, regardless which process is used.</p>				

2 directives européennes pour la réglementation des plantes transgéniques

17.4.2001

FR

Journal officiel des Communautés européennes

L 106/1

Pour être cultivée, une variété OGM est soumise à une demande d'autorisation (effets sur environnement et sur la santé)

I

(Actes dont la publication est une condition de leur applicabilité)

DIRECTIVE 2001/18/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL

du 12 mars 2001

relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement et abrogeant la directive 90/220/CEE du Conseil

DIRECTIVES

Chaque état membre peut ne pas autoriser les OGM validés par l'UE sur son territoire

DIRECTIVE (UE) 2015/412 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL

du 11 mars 2015

modifiant la directive 2001/18/CE en ce qui concerne la possibilité pour les États membres de restreindre ou d'interdire la culture d'organismes génétiquement modifiés (OGM) sur leur territoire

25 juillet 2018 (*)

« Renvoi préjudiciel – Dissémination volontaire d’organismes génétiquement modifiés dans l’environnement – Mutagenèse – Directive 2001/18/CE – Articles 2 et 3 – Annexes I A et I B – Notion d’"organisme génétiquement modifié" – Techniques/méthodes de modification génétique traditionnellement utilisées et considérées comme étant sûres – Techniques/méthodes nouvelles de mutagenèse – Risques pour la santé humaine et l’environnement – Marge d’appréciation des États membres lors de la transposition de la directive – Directive 2002/53/CE – Catalogue commun des variétés des espèces de plantes agricoles – Variétés de plantes rendues tolérantes aux herbicides – Article 4 – Admissibilité au catalogue commun des variétés génétiquement modifiées obtenues par mutagenèse – Exigence en matière de protection de la santé humaine et de l’environnement – Exemption »

Dans l’affaire C-528/16,

ayant pour objet une demande de décision préjudicielle au titre de l’article 267 TFUE, introduite par Le Conseil d’État (France), par décision du 3 octobre 2016, parvenue à la Cour le 17 octobre 2016, dans la procédure

Confédération paysanne,

Réseau Semences Paysannes,

Les Amis de la Terre France,

Collectif Vigilance OGM et Pesticides 16,

Vigilance OG2M,

CSFV 49,

OGM dangers,

Vigilance OGM 33,

Fédération Nature et Progrès

contre

Premier ministre,

Ministre de l’Agriculture, de l’Agroalimentaire et de la Forêt,

LA COUR (grande chambre),

composée de M. K. Lenaerts, président, M. A. Tizzano, vice-président, MM. L. Bay Larsen (rapporteur), T. von Danwitz, J. L. da Cruz Vilaça, E. Levits, C. G. Fernlund et C. Vajda, présidents de chambre, MM. J.-C. Bonichot, A. Arabadjiev, M^{me} C. Toader, MM. M. Safjan, E. Jarašiūnas, S. Rodin et F. Biltgen, juges,

avocat général : M. M. Bobek,

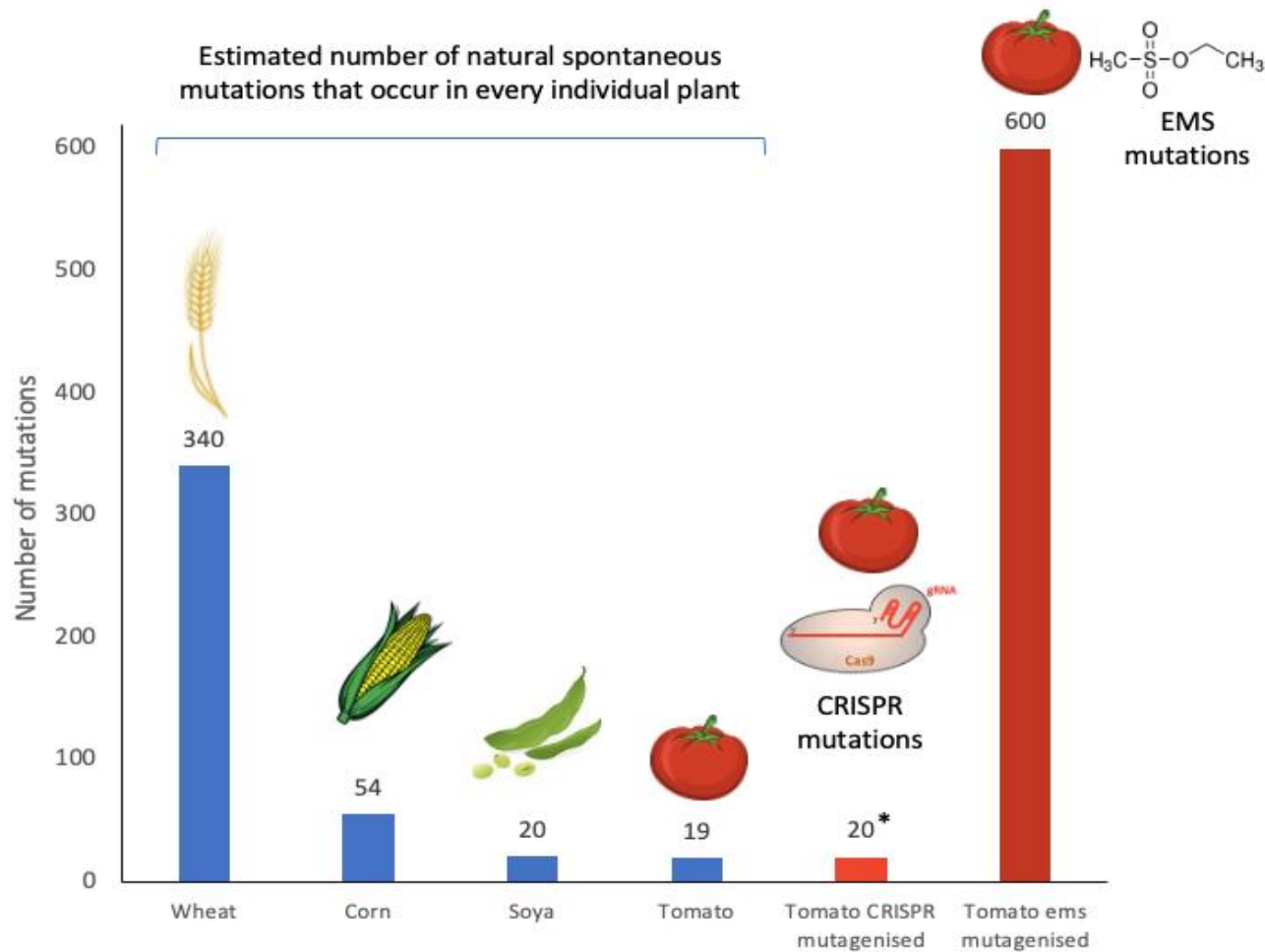
La Cour de Justice Européenne a rendu un arrêté sur le statut juridique des plantes éditées, appelées « nouveaux OGM » par leurs détracteurs. Les techniques de mutagenèse sont exclues du champ d’application de la directive. Mais elle souligne que cette exemption ne concerne que « les techniques/méthodes de mutagenèse qui ont été traditionnellement utilisées pour diverses applications et dont la sécurité est avérée depuis longtemps » et non les organismes obtenus par des techniques de mutagenèse apparues postérieurement à l’adoption de la directive. Concernant les organismes obtenus par mutagenèse traditionnelle, elle indique que les États membres sont « libres de légiférer dans ce domaine dans le respect du droit de l’Union, en particulier des règles relatives à la libre circulation des marchandises ».

Table 1. Mutation rates per nucleotide site ($\times 10^{-9}$) in different tissues^a

Species	Tissue	Cell divisions per generation ^a	Mutation rates ^b	
			Per generation	Per cell division
<i>Homo sapiens</i>	Germline	216	12.85	0.06
	Retina	55	54.45	0.99
	Intestinal epithelium	600	162.00	0.27
	Fibroblast (culture)			1.34
	Lymphocytes (culture)			1.47
<i>Mus musculus</i>	Male germline	39	38.00	0.97
	Brain		76.94	
	Colon		83.35	
	Epidermis		90.38	
	Intestine		117.69	
	Liver		237.88	
	Lung		166.83	
	Spleen		130.00	
<i>Rattus norvegicus</i>	Colon		178.38	
	Kidney		167.45	
	Liver		179.92	
	Lung		223.22	
	Mammary gland		57.70	
	Prostate		448.90	
	Spleen		101.62	
<i>Drosophila melanogaster</i>	Germline	36	4.65	0.13
	Whole body		380.92	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Germline	9	5.60	0.62
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Germline	40	6.50	0.16
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		1	0.33	0.33
<i>Escherichia coli</i>		1	0.26	0.26

^aReferences to data on numbers of germline cell divisions: human [Crow 2000]; *D. melanogaster* and mouse [57]; *C. elegans* [58]; and *A. thaliana* [59]. Numbers of cell divisions are unknown for the mouse and rat rates.

^bMammalian tissue-specific rates are given only for tissues in which at least two independent estimates have been acquired. All data on human mutation rates are taken from Lynch [36]. Data for somatic mutation rates in mouse and rat are derived from references contained within the [supplementary material online](#). References to data on germline mutation rates are: *D. melanogaster* [5], *C. elegans* [4], *A. thaliana* [Ossowski *et al.*, 2009], *S. cerevisiae* [3], and *E. coli* [24].



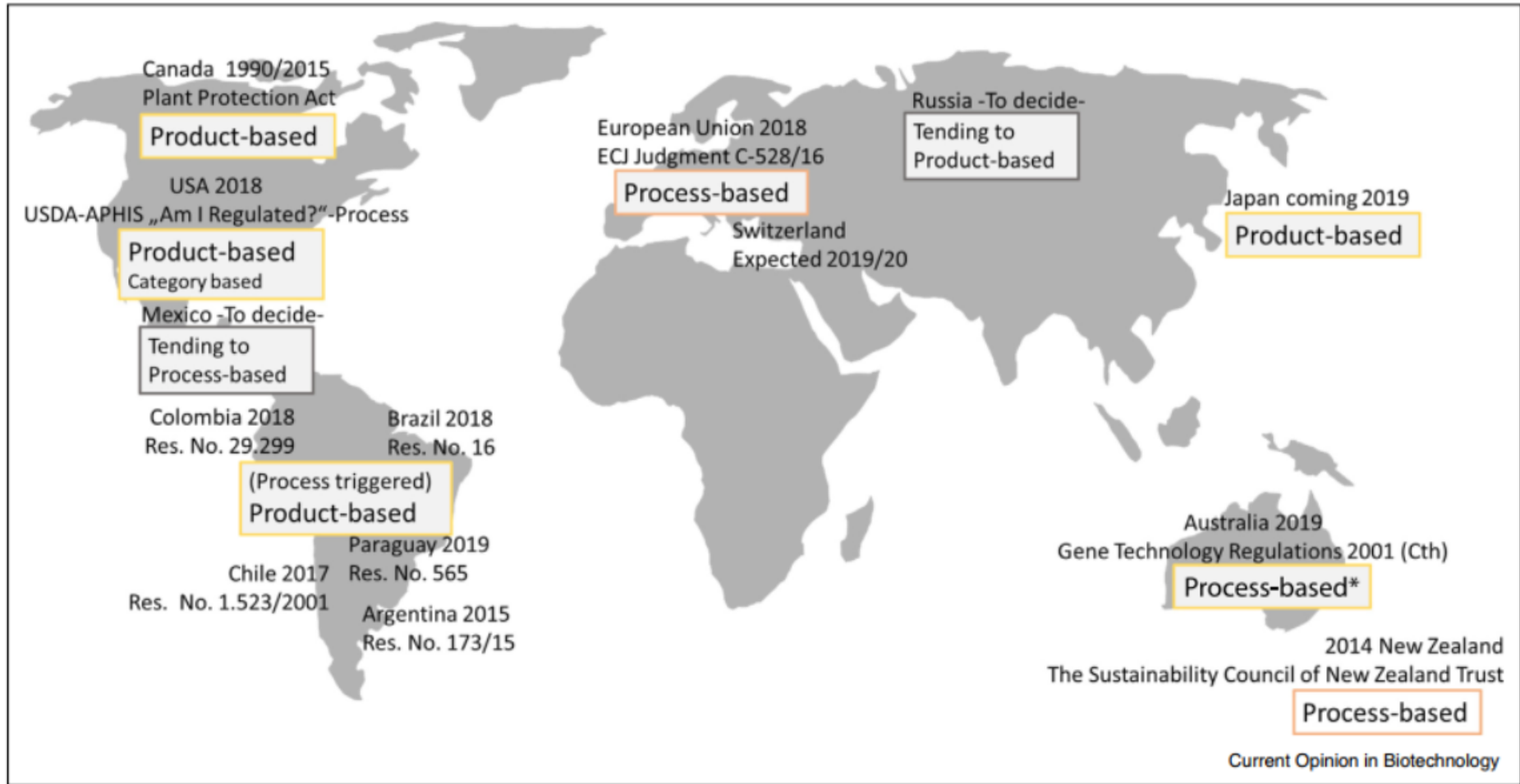
L'arrêté de la Cour Européenne de Justice ne s'appuie sur aucune donnée scientifique, c'est un point de vue uniquement juridique mais qui a donné un coup d'arrêt aux développements des plantes éditées en Europe

Taux de mutation spontanée versus induite chez certaines plantes cultivées.

* Les stratégies CRISPR-Cas utilisant des ARNg non spécifiques peuvent conduire à une activité hors cible susceptible d'augmenter le nombre de mutations (off-targets).

Réglementations au niveau mondial

Figure 1



The regulatory system for genome-edited plants in different countries worldwide. The regulation of GE plants is in most countries based on assessment of the product and the process used is only the trigger. In contradiction to this, in the EU and New Zealand the decision to regulate a plant is justified on the technique used to produce the organism. Several countries decided recently to follow a product-based approach and some will probably follow in near future. *The regulation in Australia is process-based but the decision if a GE organism is under GMO regulation is depending on the fact if it contains foreign DNA or if a nucleic acid template was added to guide the DNA-repair, so in fact product-based.

Table 1**Published field trials investigating agronomic traits of plants obtained by Genome Editing**

Plant/country	Trait	Agronomic performance	Reference
Rice - nd	Storage tolerance	nd	[17]
Rice - China	Enhanced grain size and number, more dense and erected panicles;	Better as control	[5]
Rice - China	Enhanced blast resistance	Normal	[18]
Rice - China	Early flowering/maturing	Growth inhibition in multiple knockouts	[19]
Rice - Japan	Low Cs + plants	nd	[20]
Rice - China	Multiplexing of quantitative traits	Diverse	[6*]
Rice - China	Low Cd-accumulating plants	Normal	[21]
Rice - China	Immune response	Dwarfed plants	[22]
Rice - China	Grain size	Normal	[23]
Rice - China	Grain yield	Better as control	[24]
Rice - China	Grain weight and altered protein content	Better as control	[25]
Rice - China	Waxy rice	Normal	[26]
Rice - China	Disease resistance	Normal	[7,27,28]
Rice - China	Knockout amino acid transport ('proof of concept')	Growth inhibition, yield reduction	[29]
Rice - China	Negative effect on grain architecture	Thinner and lighter grains	[30]
Rice - China	Salt tolerance in greenhouse, no salt tolerance in field observed	Normal	[9]
Rice - China	Higher grain number, higher 1000-grain weight;	Better as control	[8]
Rice - China	Early heading but yield loss	Better in <i>se14</i> -mutant	[10**]
Tomato - USA	Self pruning, early flowering,	lower total yield as control	[12]
Tomato - China	Shelf life	Normal	[31]
Tomato - USA	Control of fruit size	nd	[13]
Rapeseed - China	Multilocular siliques	nd	[32]
<i>Camelina</i> - England	Altered oil composition	Severe dwarfing in FAD2 triple knockout	[33,34]
Maize - USA	Increased grain yield under drought stress	Better as control	[11]
Peanut - China	Altered oil composition	Slight decreased pod number	[35]
Sugarcane - USA	Saccharification behavior	Normal	[16**]
Wheat - Belgium		nd	VIB

Japan Launches World's First Genome-Edited Tomato

March 24, 2021



Photo Source: Sanatech Seed Co.

The first direct consumption [genome-edited](#) tomato was launched in Japan by Sanatech Seed. The Japanese ministries in-charge have announced their determination that the genome-edited tomato will not be regulated as a genetically modified product.

Sanatech Seed's Sicilian Rouge High GABA tomato was developed using [CRISPR-Cas9](#) gene editing technology. The tomato contains high levels of gamma-aminobutyric acid (GABA), an amino acid believed to aid relaxation and help lower blood pressure. According to Shimpei Takeshita, President of Sanatech Seed and Chief Innovation Officer of Pioneer EcoScience, the exclusive distributor of the tomato, it contains four to five times more GABA than a regular tomato.

Le fait que les plantes éditées soient soumises à la réglementation OGM ou pas a un impact très fort sur le coût de mise sur le marché

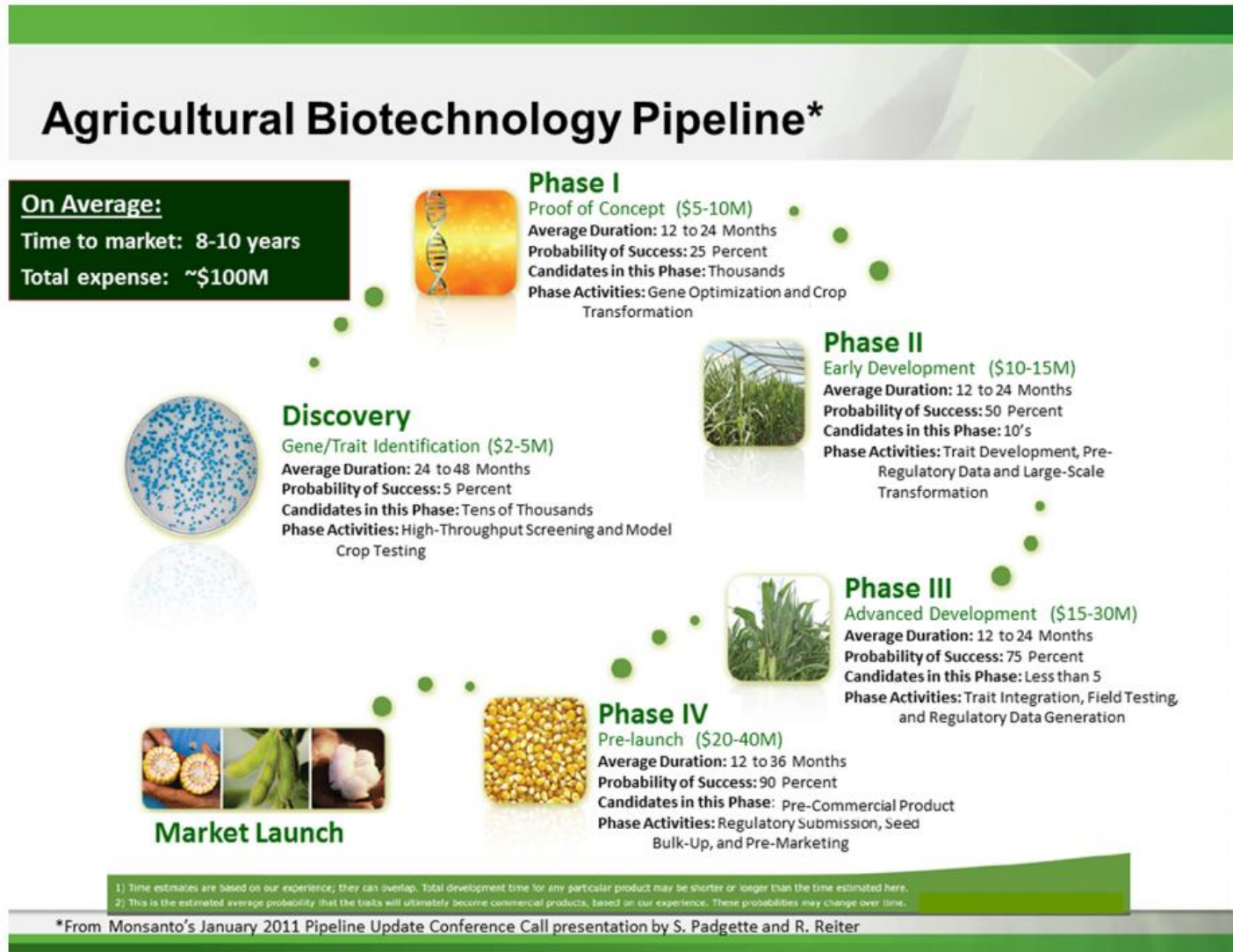


Figure 2. Example of a commercial pipeline process to develop transgenic events, which includes several phases to market launch.

Mumm, 2013

Exemple de la situation en Argentine avec la dérégulation des plantes éditées

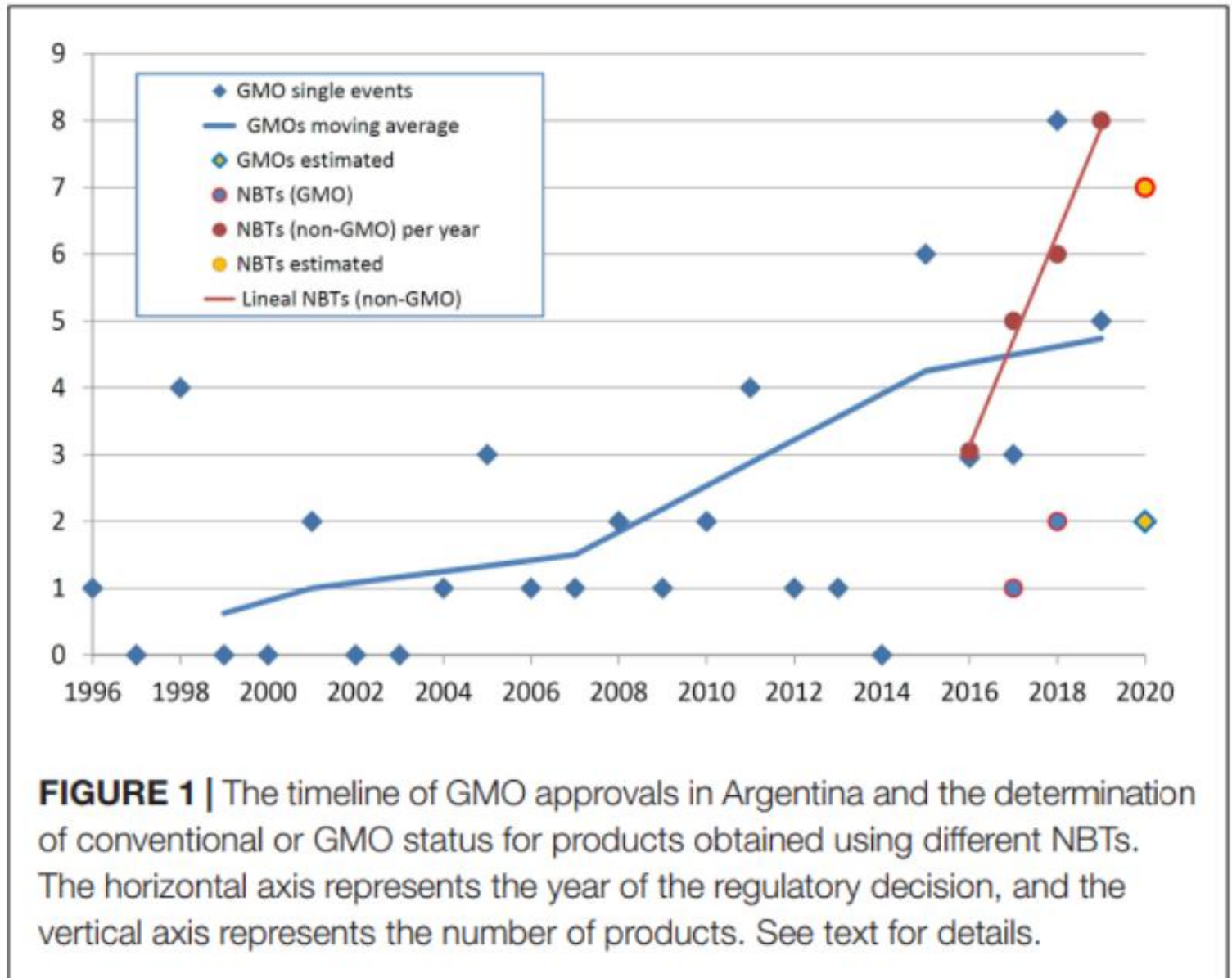


FIGURE 1 | The timeline of GMO approvals in Argentina and the determination of conventional or GMO status for products obtained using different NBTs. The horizontal axis represents the year of the regulatory decision, and the vertical axis represents the number of products. See text for details.

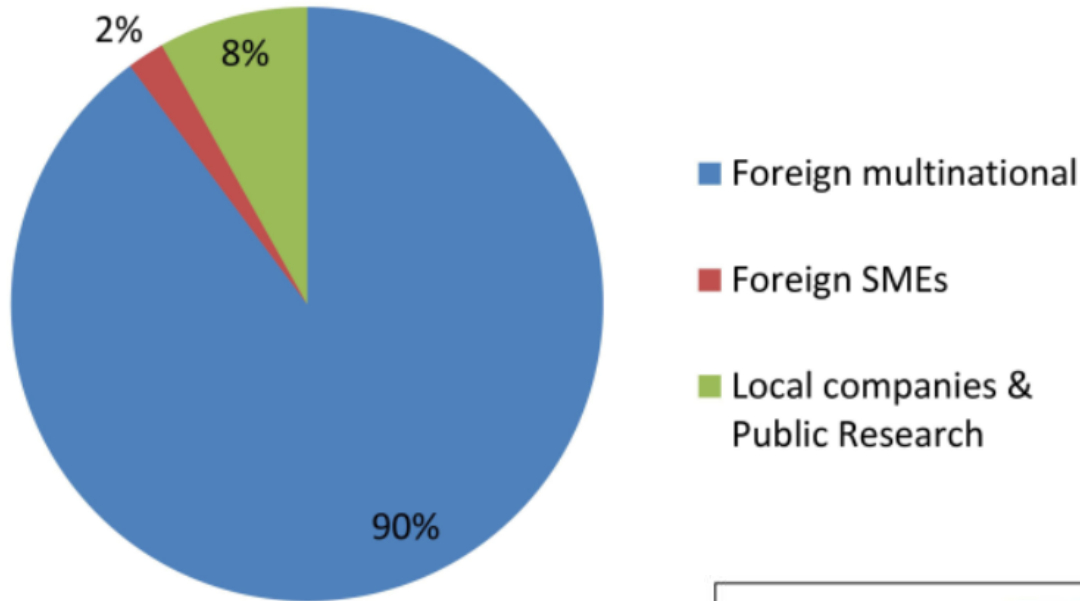


FIGURE 2 | GMO products by developer profiles.

La mise sur le marché d'une plante transgénique, soumise à réglementation, coûte très chère et est donc majoritairement le fait de grandes multinationales et concerne des espèces majeures (très cultivées dans le monde)

Dans le cas d'une dérégulation des plantes éditées, les boîtes privées locales peuvent plus facilement s'approprier la technologie et développer des espèces adaptées à des marchés locaux.

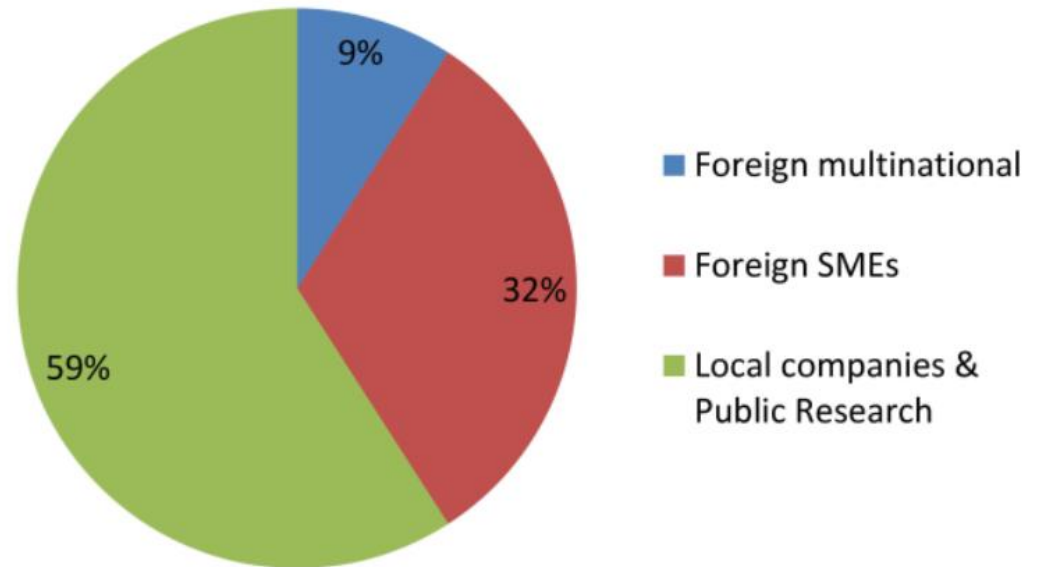


FIGURE 3 | NBT (non-GMO) products by developer profiles. See text for details.

Ce qui est reproché aux OGM

Ce qui est reproché aux OGM

Les OGM sont supposés dangereux pour la santé et l'environnement

<https://www.lemonde.fr/blog/huet/2018/12/11/ogm-poisons-la-vraie-fin-de-laffaire-seralini/>

{Sciences²}

Le blog de **Sylvestre Huet**, journaliste, spécialisé en sciences depuis 1986

11 DÉCEMBRE 2018 PAR HUET

OGM-poisons ? La vraie fin de l'affaire Séralini



13



Vous souvenez-vous ? Ces images spectaculaires de rats atteints de cancers envahissants, si gros qu'en en voit les boules sous le poil. Exhibés à la télévision. Diffusés en film, livre, articles retentissants. Et de cette formidable campagne de presse lancée par le titre choc de l'Obs : «*Oui, les OGM sont des poisons*».

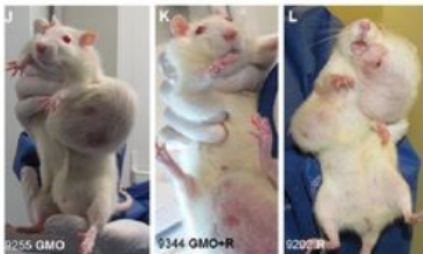
Oui, vous vous souvenez. Mais savez-vous que le 10 décembre, la revue *Toxicology Sciences* a publié l'un des articles de recherche montrant qu'il s'agissait d'une infox

Revenons à ce jour de septembre 2012. L'hebdomadaire publie alors un épais dossier à l'appui de son titre. Mais un dossier étrange : ses seules sources d'information sont l'équipe du professeur Gilles-Eric Séralini, auteur principal d'une expérience publiée le même jour et des militants opposés à l'utilisation des plantes transgéniques. Comme si l'équipe de journalistes du *Nouvel Observateur* mobilisée pour ce coup de presse n'avait besoin de personne, en particulier d'autres experts du sujet, pour juger de la solidité de la thèse présentée par l'équipe du biologiste. Étrange puisque cette thèse s'oppose frontalement à nombre d'études déjà publiées. En affirmant que les rats nourris au maïs génétiquement modifié pour tolérer le glyphosate – principe actif des herbicides les plus utilisés dans le monde par les agriculteurs, dont le fameux Round Up inventé par Monsanto – en souffrent jusqu'à la mort.

Radios et télévisions enchaînent, sans plus d'enquête critique – mais c'est difficile à ce rythme – au point que le gouvernement, par la voix de son ministre de l'agriculture, Stéphane Le Foll, annonce le soir même qu'il va demander une modification des procédures européennes destinées à expertiser les risques des plantes transgéniques avant leur mise sur le marché.

? Certainement pas.

Données brutes



Quelques mois plus tard, les deux agences publiques d'expertise concernées – [ANSES](#) et [HCB](#) – publiaient une analyse complète de l'article de Gilles-Eric Séralini *et al.* et concluaient toutes deux à son incapacité à démontrer quoi que ce soit.

Les données brutes de l'expérience montrent que sa mauvaise réalisation, en particulier par le trop faible effectif des groupes contrôles, interdisait de tirer une quelconque conclusion des observations faites sur la santé des rats au bout de deux ans de régime au maïs modifié génétiquement (1).

Toutefois, l'ANSES recommandait de conduire une expérience « vie entière » – deux ans pour les rats – afin de répondre à la question posée par Séralini : « manger ce maïs transgénique rend-il malade à long terme, en particulier cela provoque-t-il des cancers ? ». De son côté, le comité scientifique du HCB ne le recommandait pas vraiment, mais disait en substance : si cela peut rendre confiance aux citoyens et aux consommateurs, pourquoi pas ?

Cela a-t-il été fait ? Oui. Au prix d'environ 15 millions d'euros dépensés par la Commission Européenne et la France et de milliers de rats de laboratoire. Par trois expériences différentes et indépendantes. Beaucoup mieux préparées et conduites que celle de Gilles-Eric Séralini. Et pour quel résultat ? Allons droit au but, comme à l'Olympique de Marseille : RAS. Rien à signaler côté santé des rats qu'ils soient nourris 90 jours, un an ou deux ans, avec des maïs transgéniques (tant pour le maïs tolérant au glyphosate que pour celui produisant son propre insecticide). Il y a certes quelques signaux dans l'expérience française, mais plus liés à des différences entre variétés de grains utilisés, pas vraiment entre maïs transgéniques et non transgéniques.

Rêvons un peu

Avant d'en venir à ces expériences et de leurs résultats, rêvons un peu. Rêvons que les journaux, radios, télévisions, journalistes et ONG ou responsables politiques qui ont en chœur assuré à leurs publics, lecteurs, électeurs et militants que Gilles-Eric Séralini avait « prouvé » que « les OGM » sont des « poisons » mortels, vont consacrer autant d'efforts, de temps de paroles, de longueur d'articles et de propos publics à annoncer cette nouvelle désormais bien établie.

Ce rêve n'a aucune chance de se réaliser. Ces actions ne sont susceptibles de rapporter aucune voix lors d'une élection, aucun soutien d'une opinion publique à des candidats aux postes électifs plus motivés par leurs conquêtes que par la qualité du débat public. Côté presse non plus : ce type d'information normale, a-t-on appris dans les écoles de journalisme, « ne fait pas vendre ». L'homme qui mord un chien, c'est une info, mais si c'est un chien qui mord un homme, c'est une info seulement s'il en meurt. Une plante transgénique qui tue, c'est une information; elle se contente de nourrir, ce n'en est pas une. Et les près de 98% des journalistes qui ont écrit sur cette affaire sans lire l'article original de G-E Séralini ne vont pas plus lire les résultats de ces expériences ni se voir incités à les présenter par des rédactions en chef qui n'y verront pas le motif d'un titre bien saignant.



Donc, cessons de rêver. Et informons.

Quatre expériences ont été conduites. Trois européennes et une française.

[Marlon](#) qui a étudié l'état de santé des animaux d'élevage nourris avec des plantes transgéniques comparé avec celui d'animaux n'en consommant pas.

[GRACE](#) (GMO risk assessment and communication of evidence) dans un cadre toxicologique réglementaire avec du maïs MON 810 (maïs modifié pour produire la toxine insecticide Bt) avec des études à 90 jours et à un an dans l'objectif de vérifier si les protocoles à 90 jours ne ratent pas des processus plus lents.

[G-TwYST](#) (GM plants two years safety testing) qui réalise notamment l'expérience vie entière avec du maïs tolérant au glyphosate et visant l'apparition de cancers à long terme que G-E Séralini prétendait faire... mais avec des rats mieux choisis pour ce type d'étude et en nombre suffisant (50 dans chacun des groupes testés et groupes contrôles contre les dix de Séralini) permettant d'obtenir des statistiques significatives.

Ces expériences sont terminées, les résultats publiés ou en cours de publication (mais déjà connus des spécialistes car exposés en séminaires). L'expérience GMO90+ vient ainsi d'être [publiée dans Toxicological Sciences](#). Elles doivent donner lieu à des analyses croisées complètes permises par une transparence totale sur les données brutes de chacune d'entre elles. Les informations disponibles vont toutes dans le même sens : pour un rat, avaler du maïs rendu tolérant au glyphosate, ou producteur de la toxine Bt (issue d'une bactérie commune) ou un maïs standard, c'est kif kif pour sa santé. L'étude GMO90+, très minutieuse, conclut à l'absence d'effets (clinique, physiopathologique, dans les analyses d'urine...) d'une nourriture avec les maïs génétiquement modifiés. L'étude à deux ans ne montre en particulier aucun effet sur la survenue de cancers.

Quelques remarques :

► Dire que ces expériences prouvent que « *Les OGM ne sont pas des poisons* » serait une ânerie de même calibre que l'affirmation inverse du *Nouvel Observateur* en septembre 2012. Elles montrent seulement que les plantes transgéniques testées, et uniquement celles-là, ne sont pas des poisons.

► Ces expériences donnent raison une fois de plus aux biologistes qui estiment qu'il faut « une raison » (biochimique, biologique) de se demander si telle ou telle plante transgénique pose un problème de santé ou non et non supposer *a priori* que l'introduction d'un gène (ou sa manipulation à l'aide des nouvelles techniques disponibles comme CRISPR) représente un risque sanitaire plus élevé que, par exemple, un croisement artificiel utilisé en sélection de semences traditionnel. En l'occurrence, il n'y avait pas de « raison » de penser que le gène de tolérance au glyphosate ou celui permettant la production de la toxine Bt et les protéines qu'ils codent constituaient un risque sanitaire pour la consommation humaine.

► Les technologies de manipulation génétique progressent, notamment avec CRISPR. La perspective de voir des plantes modifiées pour les cultures grandit. La réponse militante consistant à vouloir à toute force suspecter *a priori* ces plantes modifiées et voulant interdire ces techniques de manière générale pourrait bien se terminer par une défaite généralisée et le recul de la vigilance. Les résultats de ces trois expériences sont ainsi agités par les semenciers utilisant la transgénèse et leurs partisans pour réclamer... que l'on ne fasse plus du tout d'études toxicologiques à 90 jours sur les plantes transgéniques. C'est le retour de bâton qu'il fallait craindre, un retour de bâton d'autant plus dangereux avec les nouvelles techniques d'édition du génome. Les décisions d'encadrement réglementaires ont en effet été prises sur la base des « *spasmes de l'opinion publique* », note un sociologue, et non sur des analyses scientifiques montrant la nécessité de prendre des précautions avec les produits d'une technologie nouvelle.

► Si ces expériences démontrent l'innocuité sanitaire de ces deux plantes transgéniques, elles ne disent rien de leur (in)utilité ou de leurs effets sociaux, économiques, agronomiques et environnementaux.

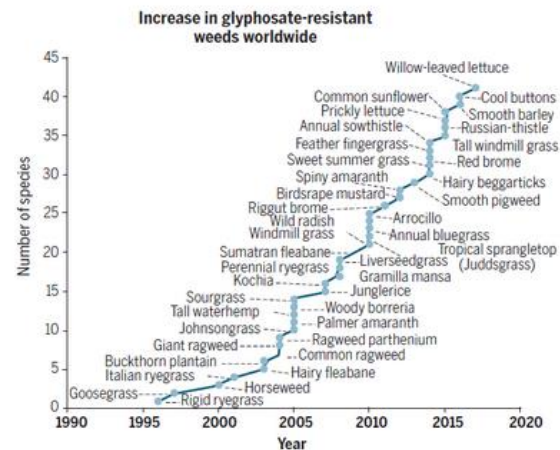
► Comme il est très peu probable que les résultats conclusifs de ces expériences réalisées avec un grand luxe de précautions seront autant diffusées auprès des citoyens et consommateurs, comme d'ailleurs de « décideurs » (élus notamment), il est regrettable que l'affaire Séralini soit celle d'un lanceur de **fausse alerte**, puisque toute fausse alerte occupe une part de la citoyenneté et de l'expertise publique disponible pour une **vraie alerte** sanitaire ou environnementale. Certes, il vaut mieux se tromper de temps en temps et traiter une fausse alerte que de passer à côté d'une vraie mais ne pas se noyer dans les fausses alertes est indispensable. Sinon, c'est l'histoire du petit garçon qui criait toujours au loup et qui n'a pas été cru lorsque le vrai loup est arrivé qui risque de survenir.

► L'Union Européenne ayant limité à 5 ans l'autorisation en cours du glyphosate, trois ans pour la France, il est probable que cet herbicide va voir son usage décliner puis disparaître en Europe. Cela règle la question des plantes transgéniques tolérantes à cette molécule qui n'auront dès lors aucun intérêt. Mais quelle sera la conséquence de cette décision suivie nulle part ailleurs dans le monde ? Si une politique cohérente de moindre recours, voire de non-recours à grande échelle, aux herbicides pour les cultures s'ensuivait, ce serait un grand bénéfice. Il ne faut toutefois pas se tromper : les changements agronomiques (rotations complexes, désherbage mécanique qui suppose des heures de tracteurs, dé-spécialisation des territoires...) économiques et de soutien aux agriculteurs (fluctuations des rendements) nécessaires pour y parvenir sont très importants ([voir ici un reportage publié dans Libération](#) sur les études de l'INRA pour le moindre ou le non recours aux herbicides en grandes cultures). En l'absence d'une telle politique, que l'on ne voit pas venir, il est à craindre que l'on constate un recours accru à d'autres herbicides dont les risques environnementaux sont pires que ceux du glyphosate.

► Le bilan d'un usage immodéré des herbicides au glyphosate, boosté ou non par les plantes transgéniques tolérantes au glyphosate, c'est aussi la montée des résistances, un phénomène général traité dans la livraison du 18 mai de la



revue *Science* par une série d'articles. La revue s'interroge : «*pouvons-nous traiter le dilemme sociobiologique de la résistance aux pesticides*», un vocabulaire montrant que le problème est tout autant économique et social que techno-scientifique. L'un des exemples les plus emblématiques est celui des herbicides au glyphosate (dont le round up de Monsanto est le plus célèbre mais loin d'être le seul). L'usage immodéré de ces herbicides dans les pays qui cultivent des plantes transgéniques résistantes au glyphosate a abouti à ce que plus de **40 espèces d'adventices** (les « mauvaises herbes » en langage savant)



souhaite des pratiques agricoles durables.

► Or, on ne peut pas se dire que l'on doit continuer une politique qui privilégie l'utilisation des produits chimiques sans précautions plus fortes. Des signaux le montrent, comme cette étude récente d'une équipe de l'INRA qui a démontré le fameux « effet cocktail » pour des pesticides à très faibles doses ingérés par des souris. [L'étude a été publiée ici](#). Pour une lecture plus aisée [voir le communiqué de l'INRA ici](#). Il faut noter que parmi les 6 pesticides (2) étudiés on trouve le fongicide à base de boscalide. Or, il fait partie des SDHI (inhibiteurs de la succinate déshydrogénase), fongicides largement utilisés dont un [collectif de scientifiques estime](#) qu'il faut instruire le dossier de risque sanitaire. Des mécanismes d'action moléculaire susceptibles d'impacter la santé humaine ont été découverts. La première réaction plutôt négative de l'ANSES (3) à cette demande ne semble pas encourageante alors que si la démonstration d'un risque justifiant leur interdiction reste à faire, les arguments scientifiques à l'appui d'une instruction sérieuses sont bien plus solides que ce qui avait été avancé par l'équipe de Séralini dans l'affaire du glyphosate. Il est tentant de se demander si l'effet « enfant qui crie au loup » n'est pas déjà en action...

► **note terminale** : il est utile de lire [in extenso le compte rendu d'un séminaire du programme RisKOGM](#) qui a notamment financé l'étude GMO90+ où l'on peut lire cette remarque d'Armin Spök de l'Université de Klagenfurt : «*il ne faut pas surestimer ce que la science ouverte est réellement capable de faire, en particulier en ce qui concerne les domaines fortement polarisants et les questions controversées de type réglementaire telles que le sujet des OGM, car la science ouverte ne peut pas résoudre ou atténuer les controverses portant sur les facteurs contextuels sous-jacents.*»

développent des résistances à cette molécule. Un processus darwinien inhérent à toute lutte chimique de ce type contre un végétal et qui suppose une stratégie de long terme autre que son usage répétitif à doses accrues devant les résistances qui émergent si l'on

↳ Pour traduire ce langage en termes plus clairs : certains participants à ces dialogues ne sont pas prêts à renoncer à leurs affirmations d'origine, même si la science normale démontre qu'elles sont erronées, parce que leur conviction est en réalité ancrée sur d'autres points, économiques, sociaux voire moraux pour lesquels le compromis n'est pas envisagé. C'est pourquoi, par exemple, Gilles-Eric Séralini et nombre de ses soutiens n'ont jamais accepté le verdict scientifique pourtant solidement établi sur leur expérience originelle et qu'il est très peu probable qu'ils admettent que les trois expériences conduites pour répondre à la question qu'ils avaient mal traitée sont, elles, conclusives.

La difficulté à organiser un débat lorsque les participants en ont une vision de combat avec vainqueurs et vaincus explique aussi [le marasme du Haut Conseil des Biotechnologies avec démissions en série et blocages](#).

Sylvestre Huet

Conclusion

La transgénèse est une technique permettant d'introduire un caractère nouveau, qu'on ne pourrait parfois pas faire en utilisant l'amélioration génétique classique. L'insertion du transgène se fait de façon non contrôlée dans le génome. En plus du gène d'intérêt, la plante conserve souvent un gène de sélection (résistance à un antibiotique ou à un herbicide).

L'édition des génomes permet de s'affranchir de ces limitations : la modification est ciblée, précise dans le génome, il n'y a pas de transgène, la construction initiale portant la Cas9 étant éliminée par croisements. C'est une technique très efficace pour faire des mutants par insertion/délétion de quelques bases ou pour faire de l'édition de base (modification de la fonction des protéines, produits des gènes). Ce type de modification pourrait se produire naturellement dans les plantes, la technique permet de gagner en efficacité.

L'utilisation de ces techniques pour l'amélioration des plantes se heurte au niveau européen aux problèmes de réglementation et d'acceptation sociétale. OGM et plantes éditées ne doivent pas être rejetées en bloc sur la base des techniques utilisées pour les produire mais devraient être évaluées au cas par cas, selon leur intérêt pour le consommateur et la planète.

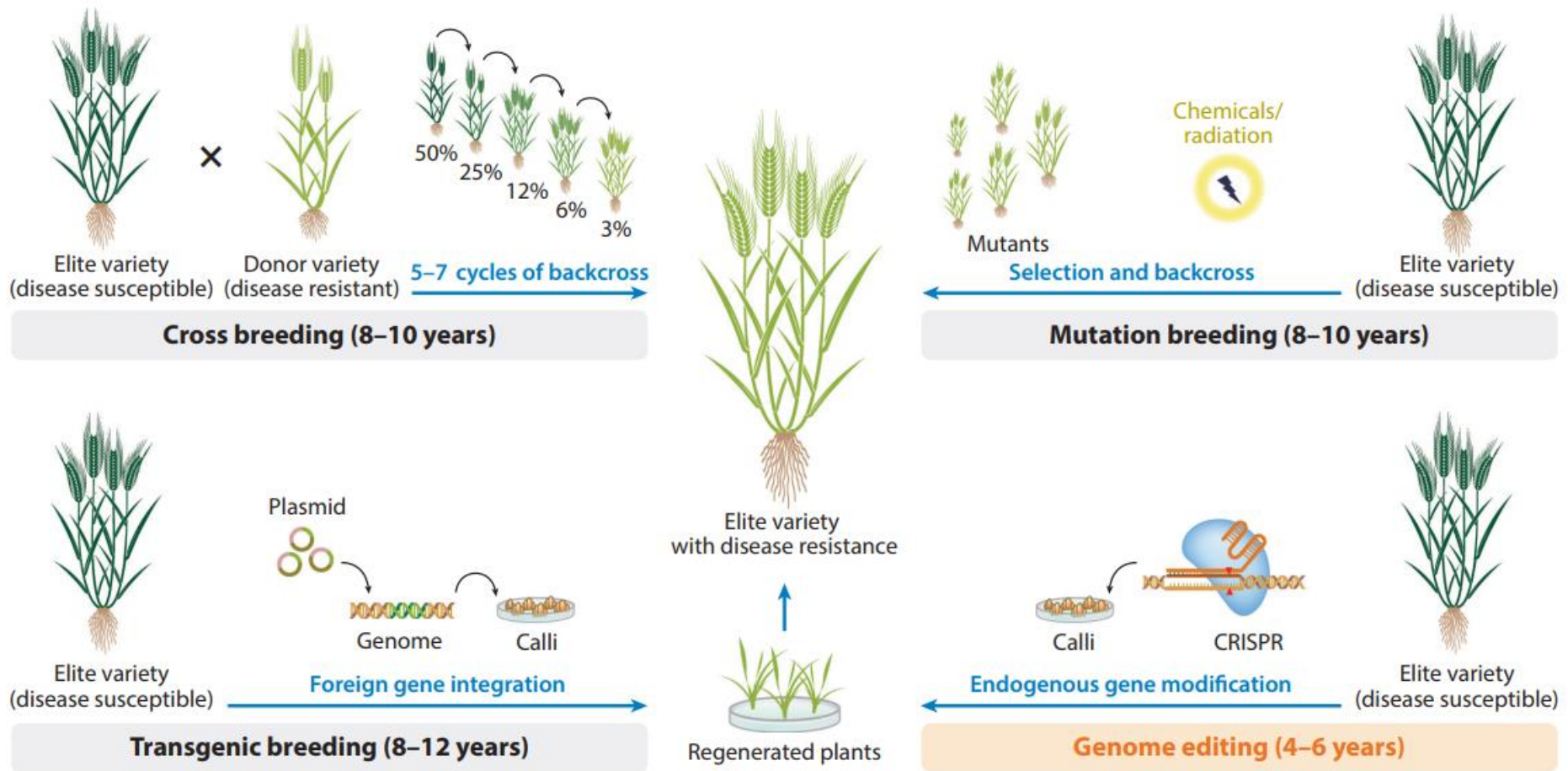
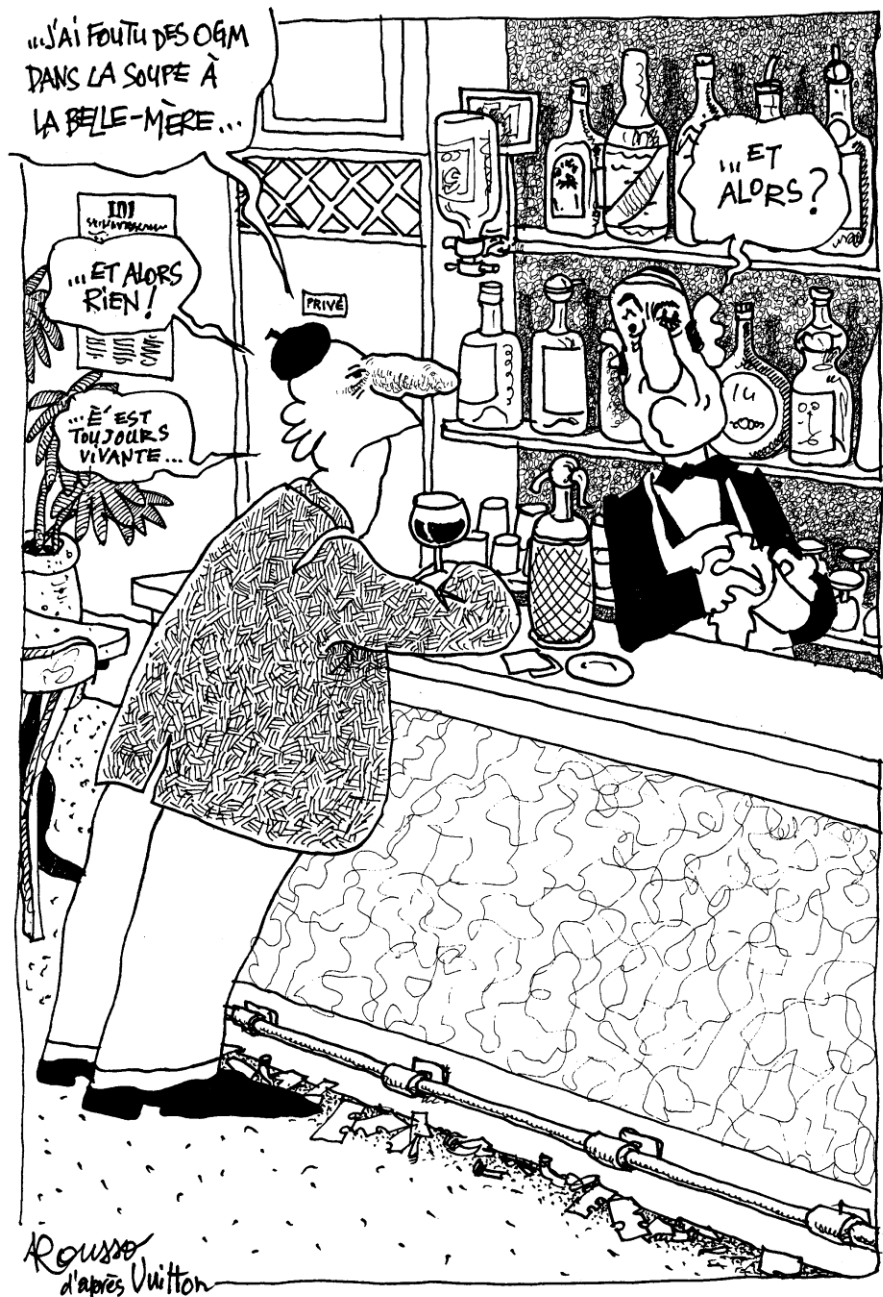


Figure 1

Comparison of breeding methods used in modern agriculture. Cross breeding: improving a trait (e.g., disease resistance) through crossing an elite recipient line with a donor line and selecting outstanding progeny with the desired trait. To introduce the desired trait from the donor line into the elite recipient line, the selected progeny must be backcrossed with the recipient line for several generations to eliminate unexpected linked traits. Mutation breeding: improving a trait using chemical or physical mutagens to treat plant materials (such as seeds) and generate mutants via random mutagenesis. Transgenic breeding: improving a trait by purposefully transferring exogenous genes into elite varieties. Genome editing: improving a trait by precisely modifying the target genes or regulatory elements or rearranging chromosomes in elite varieties.



« J'AI FOUTU DES OGM
DANS LA SOUPE À
LA BELLE-MÈRE... »

« ET ALORS
RIEN! »

« C'EST
TOUJOURS
VIVANTE... »

PRIVÉ

« ET
ALORS? »

Rousso
d'après Vuillon

Références

www.isaaa.org

DIRECTIVE 2001/18/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL

https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:303dd4fa-07a8-4d20-86a8-0baaf0518d22.0007.02/DOC_1&format=PDF

DIRECTIVE (UE) 2015/412 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015L0412&from=FR>

Articles de recherche

Jinek M., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816 (2012). doi:10.1126/science.1225829

Limera C et al., 2017. New Biotechnological Tools for the Genetic Improvement of Major Woody Fruit Species, *Frontiers in Plant Science*, 8:1418. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01418>

Lynch M. (2010). Evolution of the mutation rate. *Trends in genetics : TIG*, 26(8), 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.05.003>

Mali P, et al., 2013. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*. (10):957-63. doi: 10.1038/nmeth.2649

Metje-Sprink et al., 2020. Genome-edited plants in the field, *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 1-6, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.08.007>.

Mumm RH. A look at product development with genetically modified crops: examples from maize. *J Agric Food Chem*. 2013 Sep 4;61(35):8254-9. doi: 10.1021/jf400685y

Nekrasov, V., Wang, C., Win, J. *et al.* Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci Rep* 7, 482 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00578-x>

Romay, G., & Bragard, C. 2017. Antiviral Defenses in Plants through Genome Editing. *Frontiers in microbiology*, 8, 47. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00047>

Sánchez-León S, et al. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J*. 2018 Apr;16(4):902-910. doi: 10.1111/pbi.12837.

Sedeek et al., 2019. Plant Genome Engineering for Targeted Improvement of Crop Traits. *Front. Plant Sci*. 10:114. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00114>

Van der Meer, P et al. 2021. The Status under EU Law of Organisms Developed through Novel Genomic Techniques. *European Journal of Risk Regulation*, 1-20. doi:10.1017/err.2020.105

Whelan et al., 2020. Gene Editing Regulation and Innovation Economics. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 15 April 2020 | <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00303>

Articles de revue

Chen K, Wang Y, Zhang R, Zhang H, Gao C. 2019. CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. *Annu. Rev. Plant Biol*. 2019. 70:667–97. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100049>