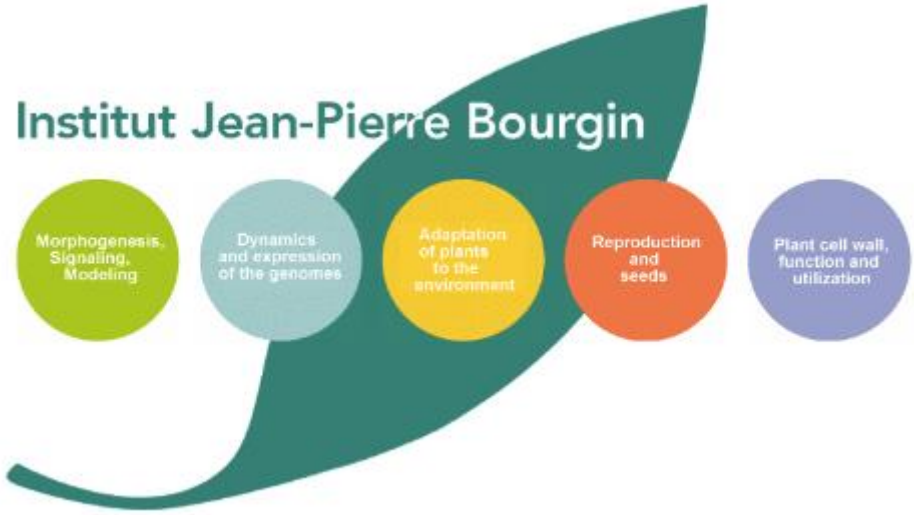
Impact des nouvelles techniques de modification ciblée du génome (CRISPR/Cas9) sur la sélection végétale



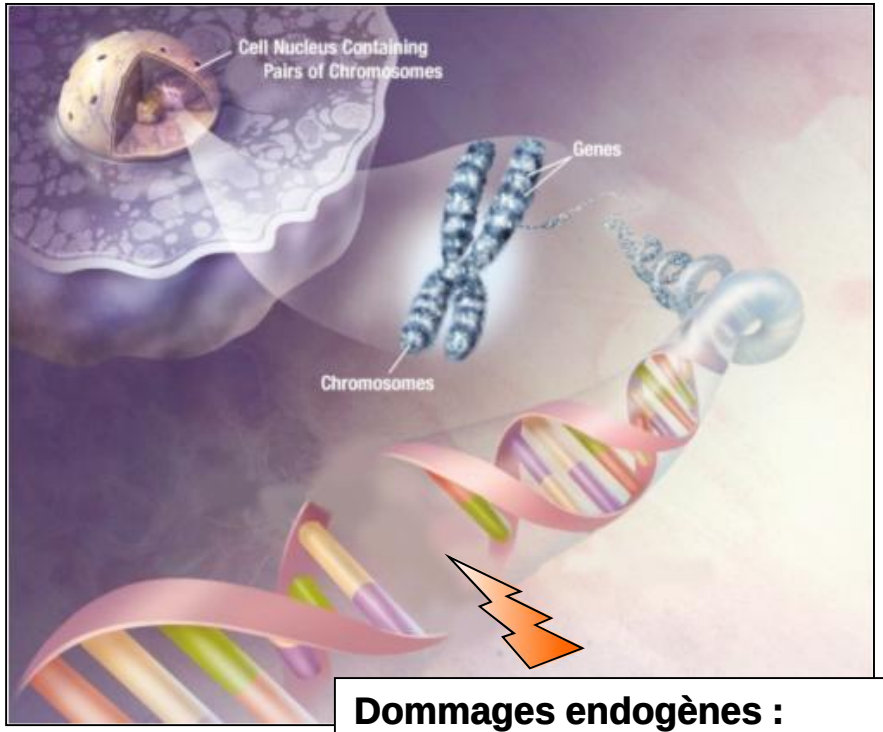
Fabien Nogué
Institut Jean-Pierre Bourgin
DNA Repair and Genome Engineering
Fabien.nogue@versailles.inra.fr

Origine de la diversité génétique

- **Derrière cette grande diversité il y a une diversité génétique**
- **La domestication = sélection de quelques gènes à « effet fort » (qualitatif).**
- **La sélection variétale = sélection d'un plus grand nombre de gènes avec des effets plus subtiles et en interactions (quantitatif).**

Origine de la diversité génétique

- Mutations spontanées -



Dommages endogènes :

- ✓ dérivés réactifs de l'oxygène
- ✓ erreurs de réplication

Dommages exogènes :

- ✓ UV
- ✓ rayons gamma
- ✓ chimiques (EMS)

Arabidopsis

- ➢ Le taux de mutation par génération est de 1 sur 140 millions de paires de bases chez Arabidopsis.
- ➢ C'est du même ordre chez l'homme.

- ➢ **au moins 10 cassures de l'ADN par cellule par jour**

Origine de la diversité génétique

- Mutations spontanées -

120 mutations entre le grain et sa plante mère. Semis à 2 millions de pieds/ha, donc 240 millions de mutations dans un champs de 1 ha soit 1 mutation tous les 70 pb. Il y a 90000 gènes chez le blé.

- Dans un champ de 1 ha tous les gènes du blé ont au moins une mutation.

Origine de la diversité génétique

- Mutations spontanées -

- **Exemples :**

Riz

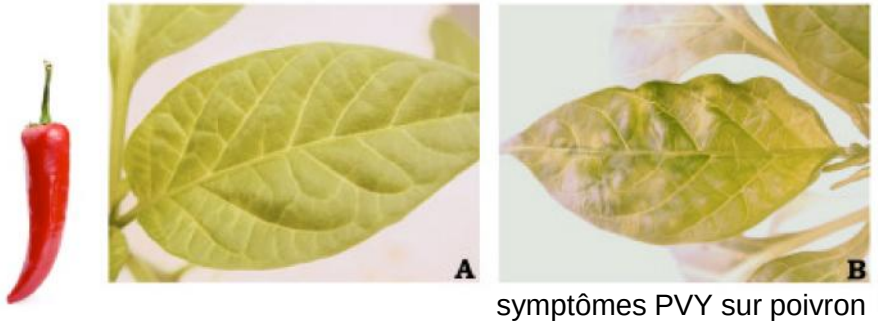
SH4 est un gène contrôlant l'adhérence de la graine à l'épi. Sélection il y a ~ 9000 ans.

mutation ponctuelle

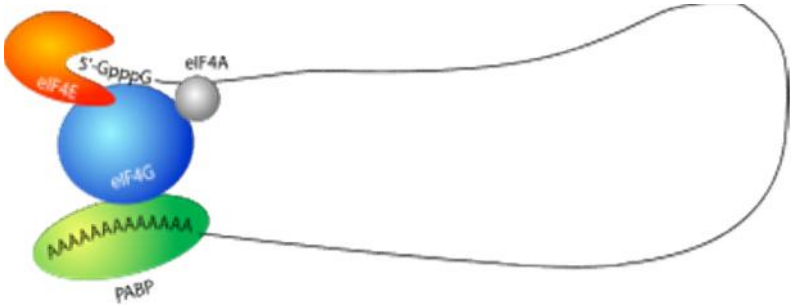
```
  1  MSGSSADPSP SASTAGAAVS PLALLRAHGH ARGHLTATPP SGATGPAPPP
 51  PSPASGSAPR DYRKGNWTLH ETLILITANR LDDDRRAGVG GAAAGGGGAG
101  SPPTPRSAEQ RWKWVENYCW KNGCLRSQNQ CNDKWDNLLR DYKKVRDYES
151  RVAAAAATGG AAAANSAPLP SYWTMERHER KDCNLPTNLA PEVYDALSEV
201  LSRRAARRGG ATIAPTPPPP PLALPLPPPP PPSPPKPLVA QQQHHHHGHH
251  HHPPPPQPPP SSLQLPPAVV APPPASVSAE EEMSGSSESG EEEEGSGGEP
301  EAKRRRLSRL GSSVVRSATV VARTLVACEE KRERRHRELL QLEERRLRLE
351  EERTEVRRQG FAGLIAAVNS LSSAIHALVS DHRSGDSSGR
```

(Adapted from Li et al., 2006)

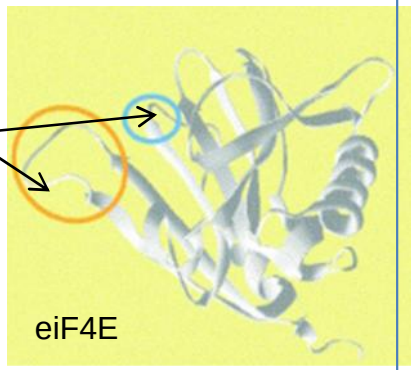
Poivron



symptômes PVY sur poivron



la résistance chez le poivron est associée au changement de 2 acides aminés dans 2 régions contigus de la protéine eiF4E.



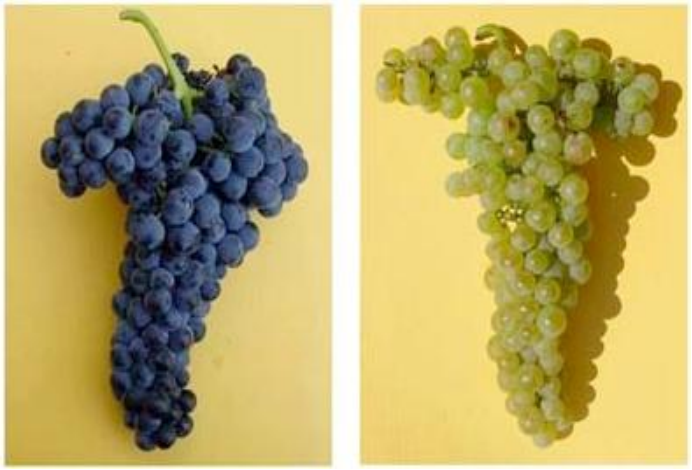
(Adapted from Robaglia and Caranta 2006)

Origine de la diversité génétique

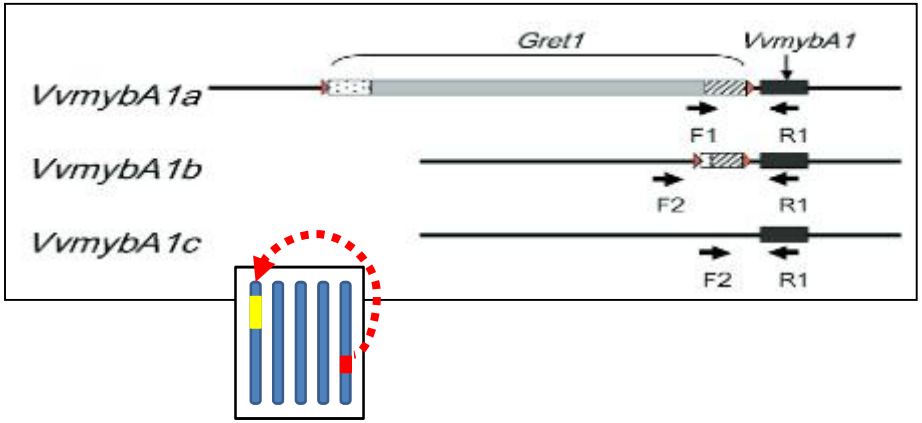
- Mutations spontanées -

- **Autres exemples :**

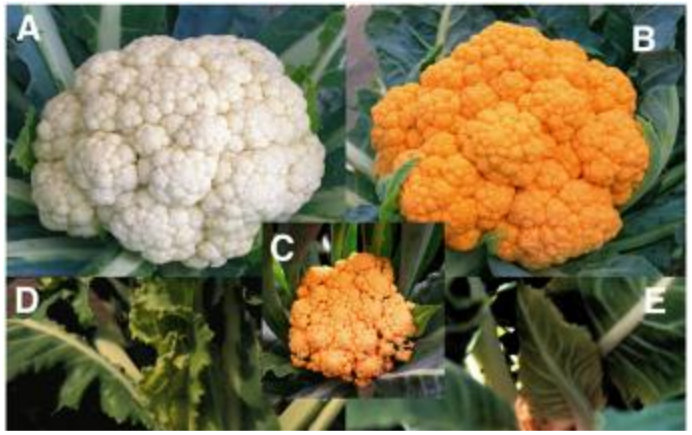
Raisin



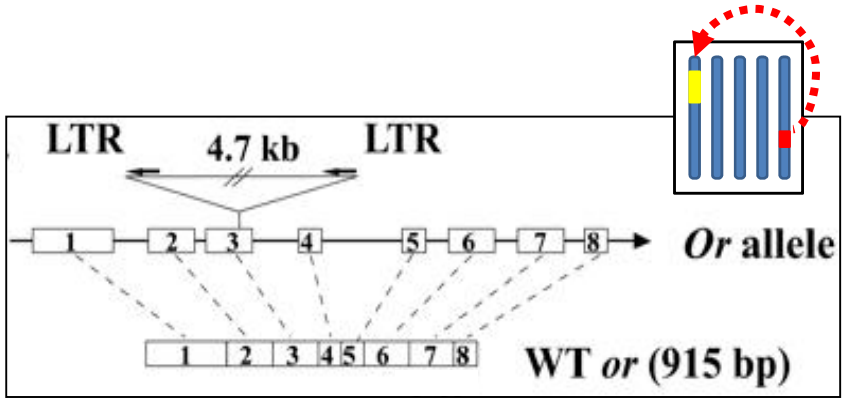
Le gène VvmybA1 contrôle la couleur des grappes (Kobayashi et al., 2004). Sélection ~ 3000 ans.



Chou fleur



Le gène *Or* contrôle l'accumulation du beta-carotène (Lu et al., 2006). Sélection en 1975.



Diversité génétique base de l'amélioration des plantes

Les génomes végétaux ne sont pas « gravés dans la pierre »

Chez le maïs : une vingtaine de mutations spontanées entre le grain et sa plante mère.

semences commerciales

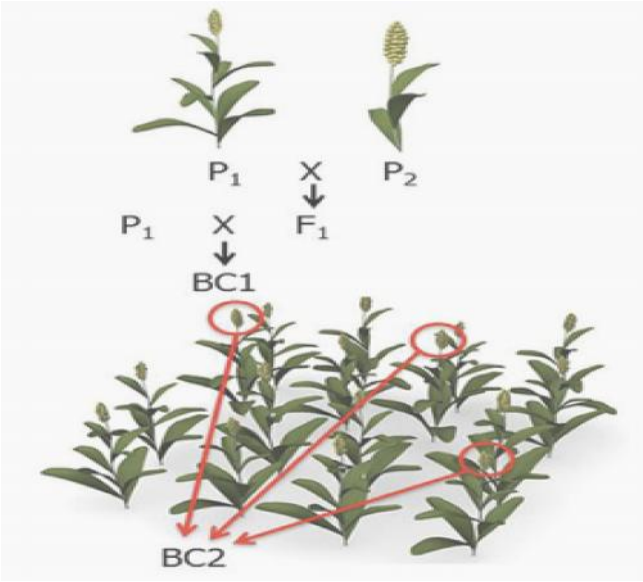
semences paysannes

- l'instabilité génétique est vraie pour tous les types de semences et est à la base de la sélection variétale ou massale.

Amélioration des plantes

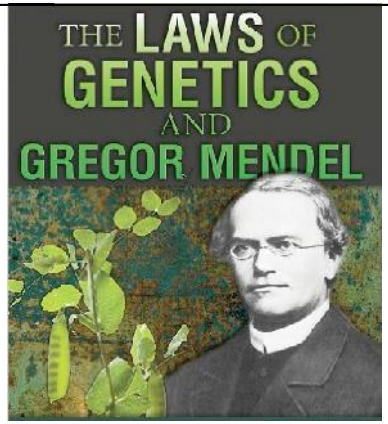
- la rencontre de Mendel et Darwin -

Sélection classique

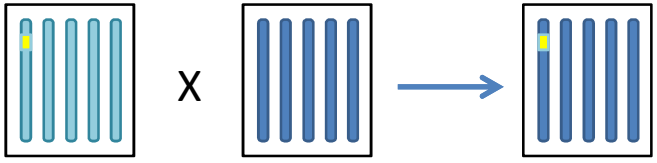


Diversité génétique:

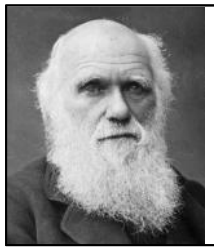
- Mutations spontanées
- Croisements interspécifiques
- Mutations induites



« nos plantes cultivées sont, à peu d'exceptions près, des membres de différentes séries d'hybrides…et la main de l'homme obtient plus d'une variation qui devrait disparaître à l'état de nature » *(Mendel 1866)*



variété A *variété B* *variété B modifiée*



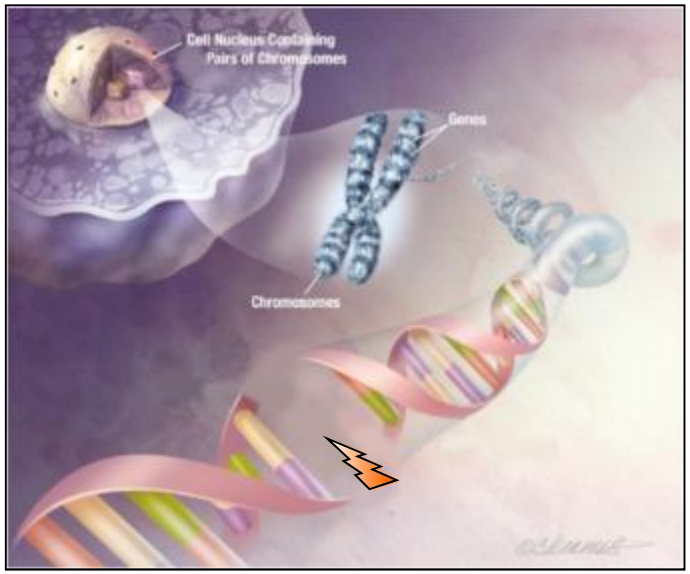
« la clé est la puissance de la sélection cumulative de l'homme: la nature donne variations successives; l'homme les ajoute dans certaines directions utiles pour lui » *(Darwin, 1859)*

➢ Depuis le début de l'agriculture l'homme utilise, plus ou moins consciemment, deux concepts, l'hérédité (Mendel) et l'évolution (Darwin) pour combiner des allèles d'intérêts et obtenir des variétés possédant de nouvelles caractéristiques qui lui sont utiles.

Amélioration des plantes

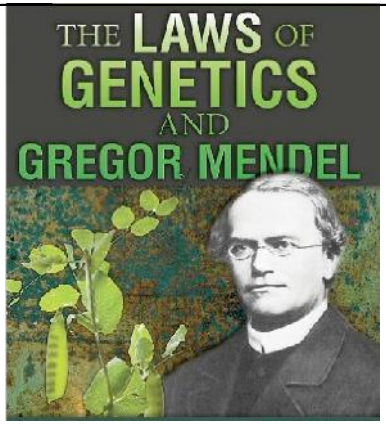
- la rencontre de Mendel et Darwin -

modification ciblée
du génome

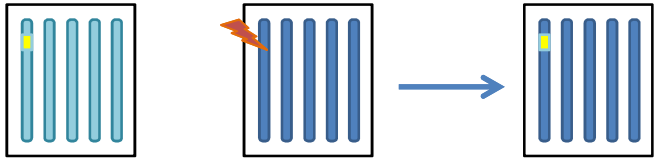


Diversité génétique:

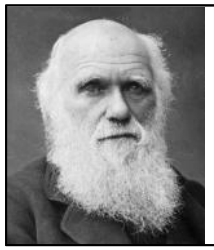
- Mutations spontanées
- Croisements interspécifiques
- Mutations induites
- Modification de gènes



« nos plantes cultivées sont, à peu d'exceptions près, des membres de différentes séries d'hybrides…et la main de l'homme obtient plus d'une variation qui devrait disparaître à l'état de nature » *(Mendel 1866)*



variété A *variété B* *variété B modifiée*

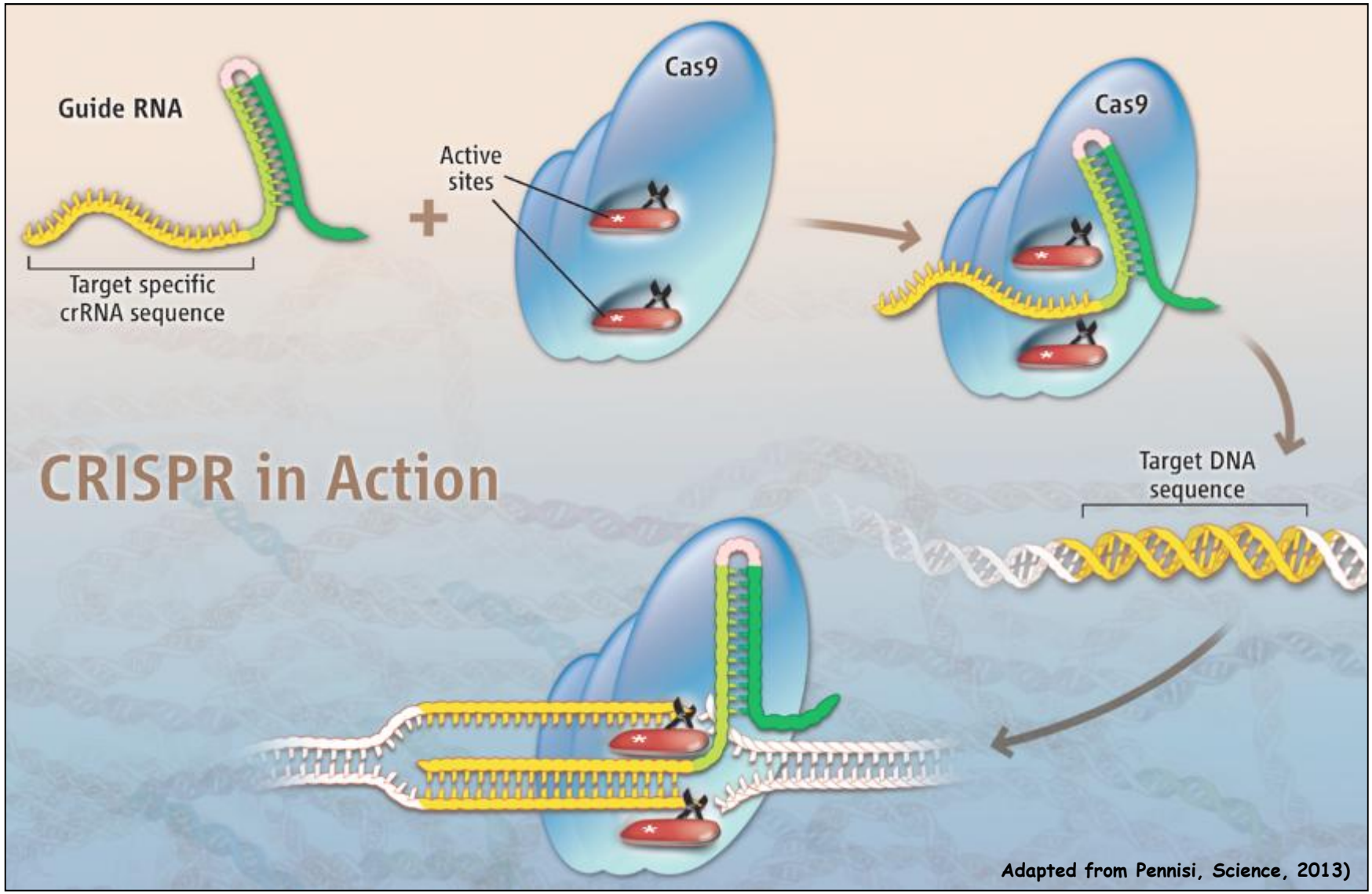


« la clé est la puissance de la sélection cumulative de l'homme: la nature donne variations successives; l'homme les ajoute dans certaines directions utiles pour lui » *(Darwin, 1859)*

- Modification du gène d'intérêt et de lui seul
- Gain de temps pour la création de nouvelles variétés
- Exploitation non limitée de la diversité inter espèces

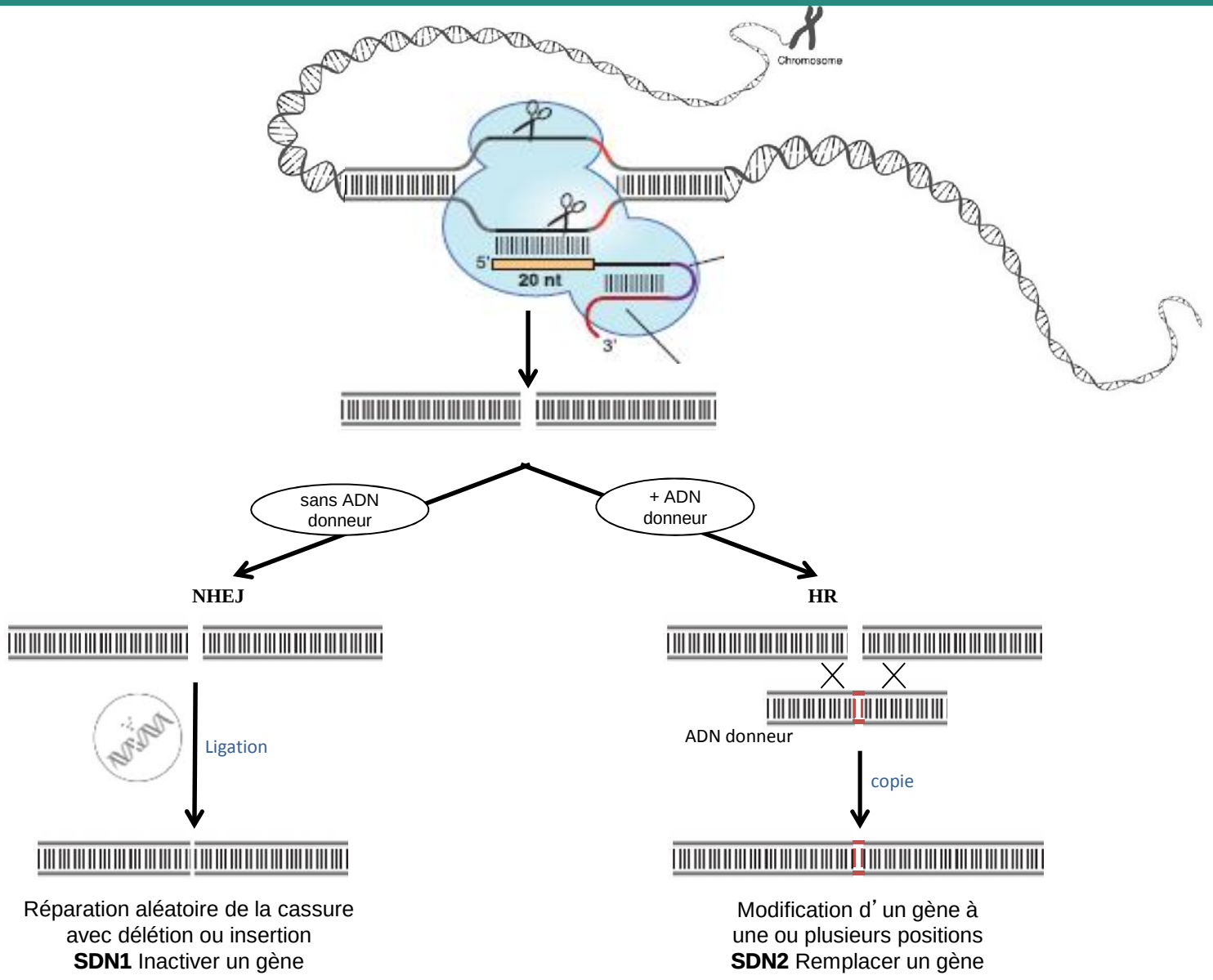
Le système CRISPR-CAS9

- pour l'ingénierie du génome -



Le système CRISPR-CAS9

- casser puis réparer -

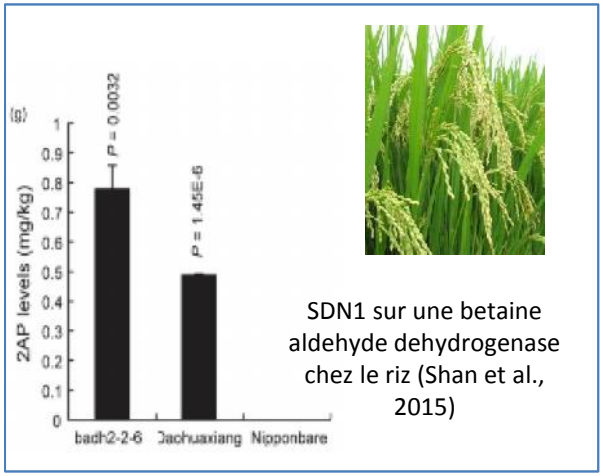


Réparation aléatoire de la cassure avec délétion ou insertion
SDN1 Inactiver un gène

Modification d'un gène à une ou plusieurs positions
SDN2 Remplacer un gène

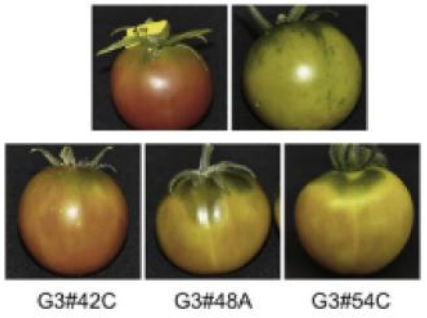
L'ingénierie des génomes végétaux
- exemples d'inactivation de gènes SDN1 -

- améliorer la qualité « fragant rice » (e.g. betaine aldehyde dehydrogenase).



SDN1 sur une betaine aldehyde dehydrogenase chez le riz (Shan et al., 2015)

- Allonger la durée de conservation (e.g. facteur de transcription).

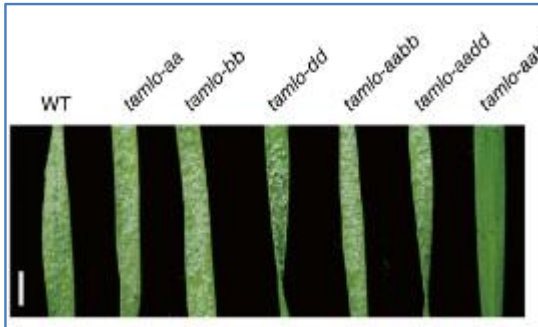


SDN1 sur le facteur de transcription RIN chez la tomate (Ito et al., 2015)

- Diminuer les composés "antinutritionnel" (e.g. acrylamide chez la pomme de terre).

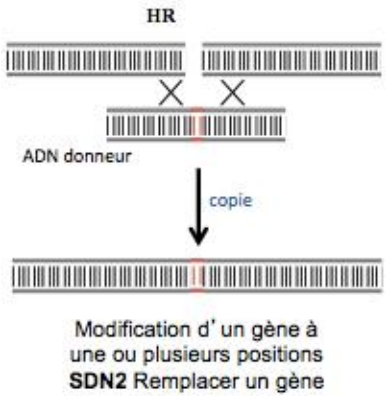
SDN1 sur une invertase vacuolaire chez la pomme de terre (Clasen et al., 2016)

- Rendre des plantes plus résistantes à certains pathogènes (e.g. MILDEW- RESISTANCE LOCUS).

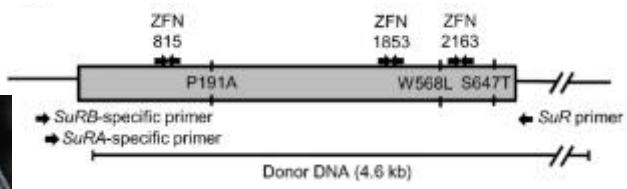


SDN1 sur les gènes MLO chez le blé (Wang et al., 2014)

L'ingénierie des génomes végétaux
- exemples de réécriture de gène SDN2 -

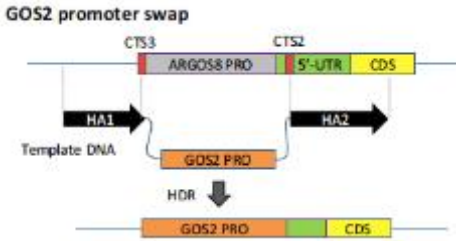


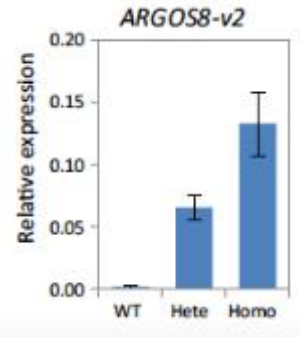
➢ Obtenir un résistance à un herbicide.



SDN2 sur l'acetolactate synthase chez le tabac (Townsend et al., 2009)

➢ Augmenter le rendement en condition de stress hydrique.





✓ Recherche dans 419 lignées de maïs d'une lignée qui "surexprimerait le gène ARGOS8.

✓ Remplacement du promoteur du gène ARGOS8 via SDN2 (Shi et al., 2016)

L'ingénierie des génomes végétaux

- la recherche en France -

- GENIUS
  - **G**enome **en**gineering **i**mprovement for **u**seful plants of a **s**ustainable agriculture
- Programme de 7 ans (début septembre 2012)
- Coût: 21,3 M€
- Participants

  10 laboratoires académiques (8 INRA), 5 partenaires privées

  19 équipes de recherche

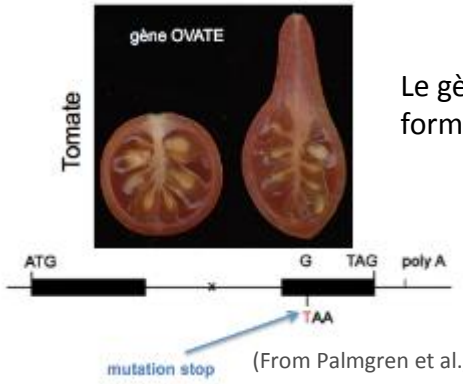
  87 scientifiques + ingénieurs + techniciens

- SDN1 chez le maïs, le blé, le riz, la tomate, la pomme de terre, le pommier, le peuplier.

- SDN2 chez le riz et la tomate.

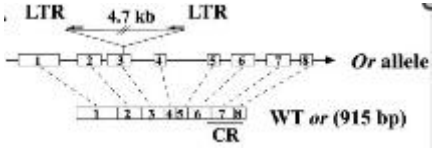
L'ingénierie des génomes végétaux
- quel potentiel ? -

- Intérêt du SDN1 : Potentiellement tous les caractères dont le gène causal a été identifié et dont l'allèle favorable correspond a une version inactive.



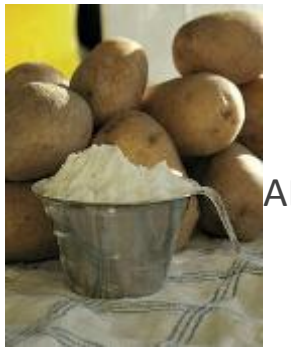
Le gène Ovate impliquée dans la forme du fruit.

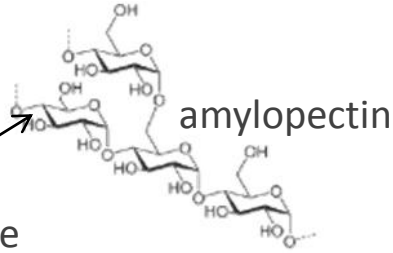
(From Palmgren et al., 2014)



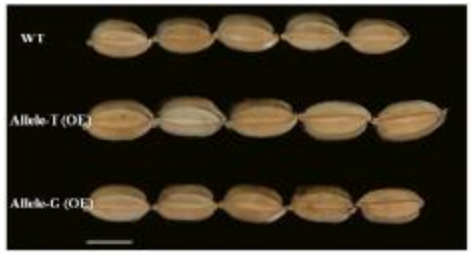
Le gène OR est présent chez toutes les plantes. Possibilité de faire produire du β carotène à des graines ou des fruits, qui en sont dépourvus.

(From Lu et al., 2006)

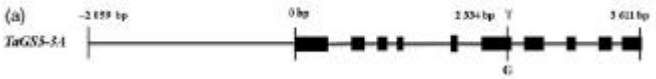




groupe de Per Hofvander (Suède)
Genius project JE Chauvin INRA Ploudaniel



Gène GS5, Serine carboxypeptidase impliquée dans la taille des grains chez le blé et le riz



(From Ma et al., 2016)

L'ingénierie des génomes végétaux
- quel potentiel ? -

- Intérêt du SDN2 : potentiellement tous les caractères dont le gène causal a été identifié ou peut l'être (QTLs et autres)

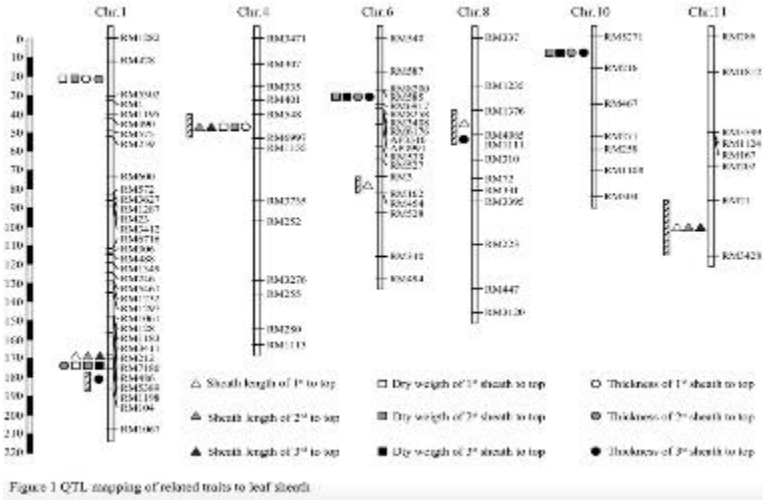
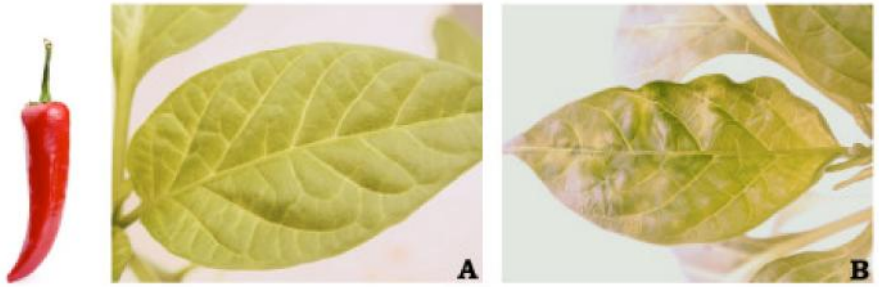
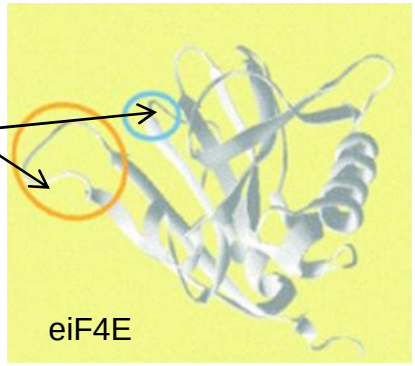


Figure 1 QTL mapping of related traits to leaf sheath

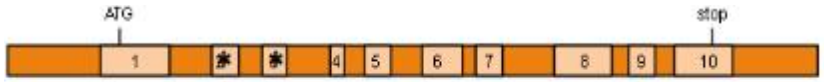
symptômes PVY sur poivron



la résistance chez le poivron est associée au changement de 2 acides aminés dans 2 régions contigus de la protéine eiF4E.



Chez la pomme de terre



gène eiF4E modifié

Genius project M. Mazier INRA Avignon

modifier le génome
potentiel pour l'amélioration des plantes

- gains pour la rapidité d'assemblage des allèles/gènes d'intérêt,
- possibilité d'aller chercher des gènes d'intérêt chez d'autres espèces,
- possibilité d'apporter des allèles d'intérêts chez des espèces « orphelines » et pour des caractères adaptés à des environnements très spécifiques (possibilité de faire du « sur mesure »),
- opportunité pour augmenter la diversité génétique
  ➔ concept de « rewilding »

fruitiers

sorgho

Niébé

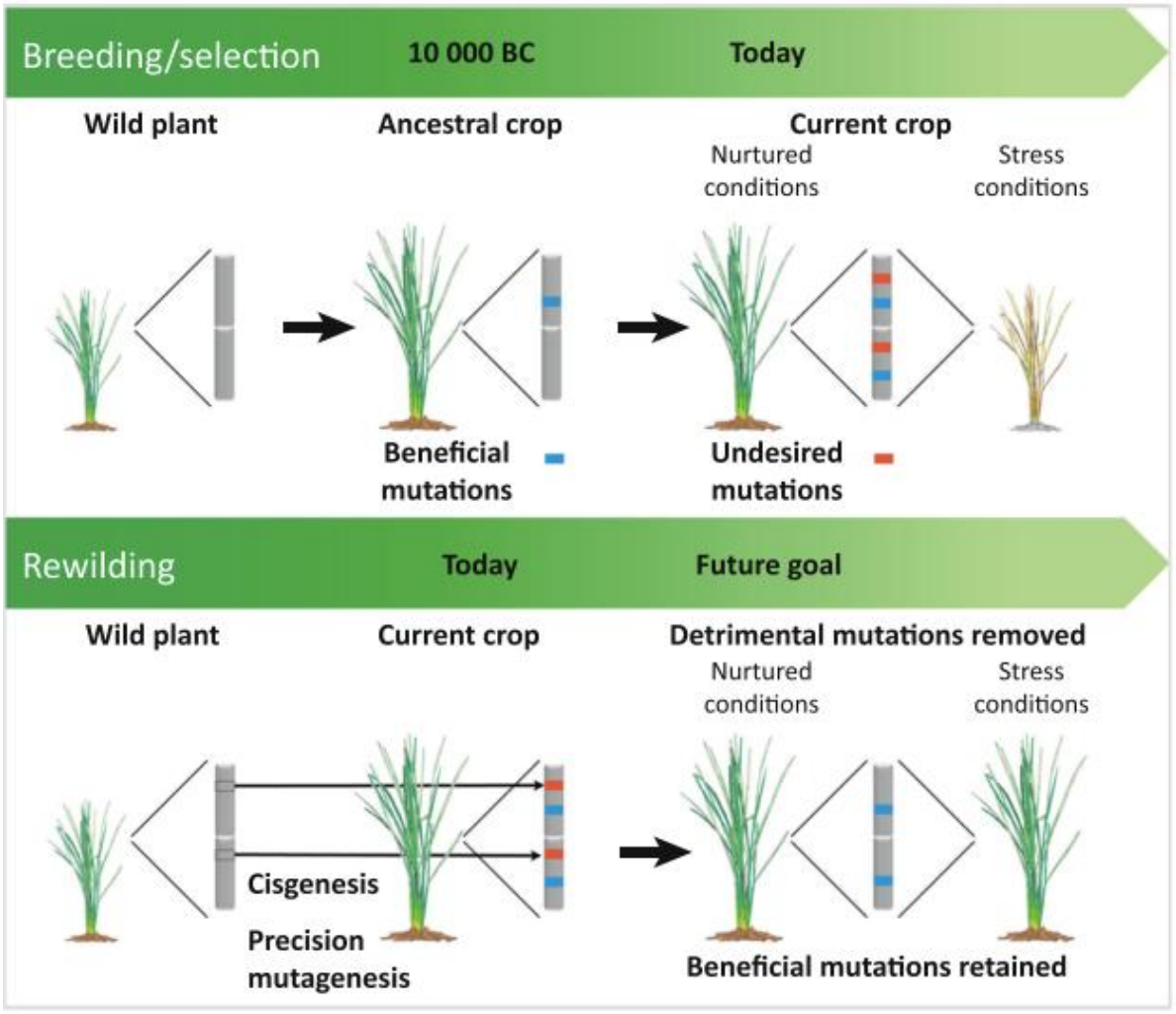
Manioc

Pois d'Angole

Igname

modifier le génome
potentiel pour l'amélioration des plantes

- opportunité pour augmenter la diversité génétique
  ➔ concept de « rewilding »



(from Palmgren et al., 2015)

modifier le génome
potentiel pour l'amélioration des plantes

- gains pour la rapidité d'assemblage des allèles/gènes d'intérêt,

fruitiers

plantes à multiplication végétative

- possibilité d'aller chercher des gènes d'intérêt chez d'autres espèces,

sorgho

Niébé

- possibilité d'apporter des allèles d'intérêts chez des espèces « orphelines » et pour des caractères adaptés à des environnements très spécifiques (possibilité de faire du « sur mesure »),

Manioc

Pois d'Angole

- opportunité pour augmenter la diversité génétique

➔ concept de « rewilding »

Igname

- opportunité pour reconsidérer la législation sur les technologies d'amélioration des plantes,

➔ Prise en compte du caractère apporté à la nouvelle variété et non de la technologie d'obtention de ce nouveau caractère ?