

# La cisgénèse et la résistance au mildiou. Ingénierie génétique de précision pour l'amélioration des plantes

Dr. Yordan MUHOVSKI

CLÔTURE DU PROJET GEREPHYTI – GEMBLoux 6 FÉVRIER 2018

# Plan de l'exposé

## I. La cisgénèse et la résistance au mildiou

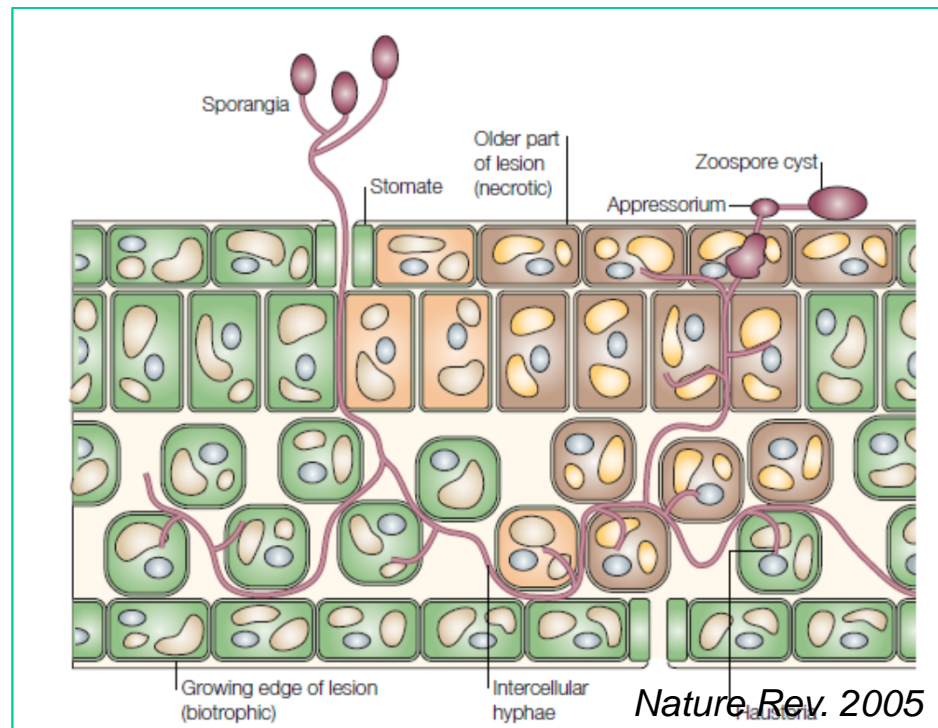
- Introduction, méthodologie, résultats, conclusions

## II. Ingénierie génétique de précision pour l'amélioration des plantes

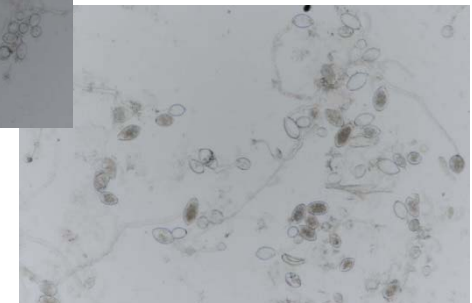
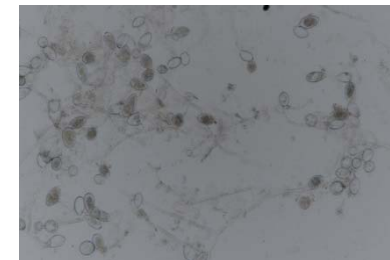
- new breeding technologies

# I. La cisgénèse et la résistance au mildiou

- Le mildiou - *P. infestans*, la Grande Famine en Ireland (1845-1852)
- Pertes globales
- Prévention et traitement



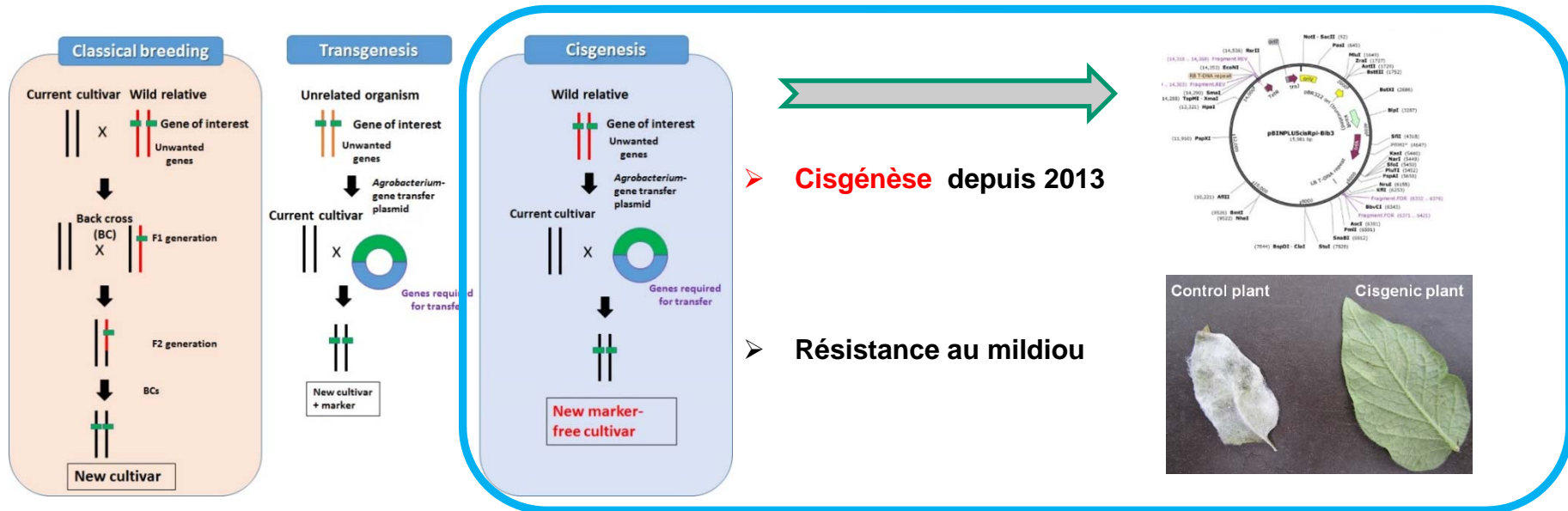
« Famine memorial » à Dublin



# GEREPHYTI

- L'objectif général du projet est l'obtention de clones/variétés améliorés pour une résistance durable au mildiou.
- ✓ L'amélioration du comportement des variétés est envisagée par l'utilisation des techniques classiques de croisements en employant toutefois le potentiel des nouvelles techniques comme la cisgénèse.

# Approche cisgénique



Late blight  
resistant  
potato cultivar

➤ Sélection classique en cours au CRA-W depuis 2005

# La cisgénèse

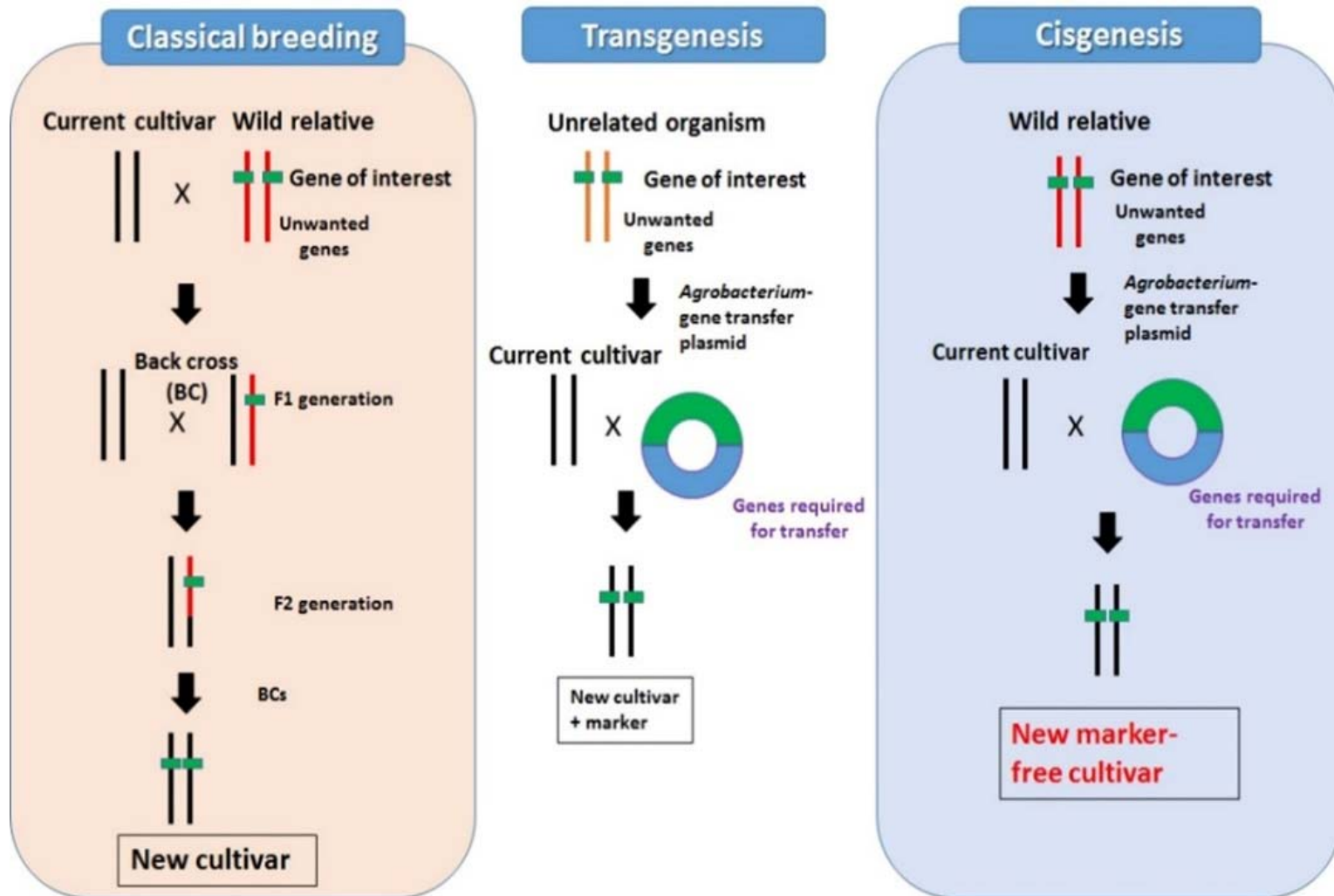
- Le terme de 'cisgénèse' a été employé pour la première fois par Schouten et al. (2006), affinant le concept 'intragenèse' annoncé par Rommens en 2004.

# Caractéristiques principales des différents concepts de modification génétique

- Transgénèse**
- les gènes « étrangers » de n'importe quel organisme
  - gènes marqueurs de toute origine pour la sélection (herbicides, antibiotiques...)
- Intragenèse**
- gènes « étrangers », les éléments régulateurs issus de gènes de la plante elle-même ou d'espèces sexuellement compatibles
  - éléments peuvent être réarrangés
  - approches de « gene silencing » possibles
  - l'utilisation d' *Agrobacterium* pour le transfert de gènes
  - les marqueurs de sélection sont retirés
- Cisgénèse**
- gènes à partir d'espèces sexuellement compatibles
  - gènes d'intérêt avec leurs promoteurs, exons, introns et terminateurs
  - utilisation des séquences d'*Agrobacterium* (ADN-T) pour le transfert de gènes
  - les marqueurs de sélection sont retirés



# Sélection classique vs. cisgénèse



# Les questions de réglementation concernant la cisgénèse

- Selon l'EFSA (European Food Safety Authority, 2012): les plantes cisgéniques pouvaient être utilisées en toute sécurité dans l'environnement et l'alimentation humaine et animale, à l'instar des plantes sélectionnées à l'aide des méthodes classiques



EFSA Journal 2012;10(2):2561

## SCIENTIFIC OPINION

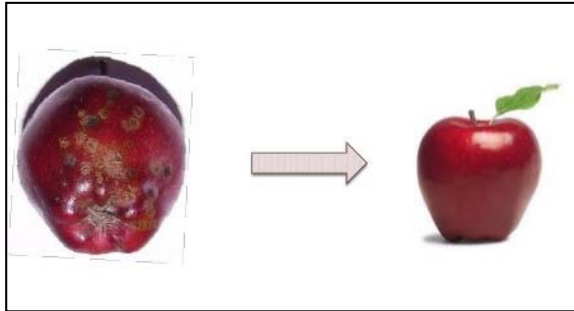
**Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis<sup>1</sup>**

**EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO)<sup>2, 3</sup>**

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy

# Cultures actuellement modifiées par cisgénèse

Vanblaere et al. 2011



Pomme; résistance à la tavelure

Holme et al. 2012



Orge; amélioration de la biodisponibilité du phosphate

Han et al. 2011



Peuplier; croissance différent

Projet DuRPh (2006-2015); Jo et al. 2014



Pomme de terre; résistance au mildiou

Dhekney et al. 2011



Vignes; résistance aux maladies

# Approche cisgénique

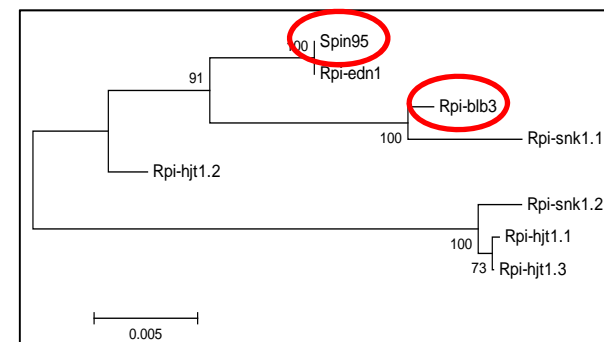
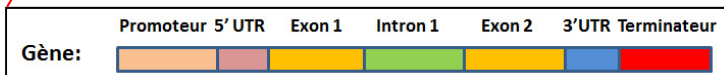
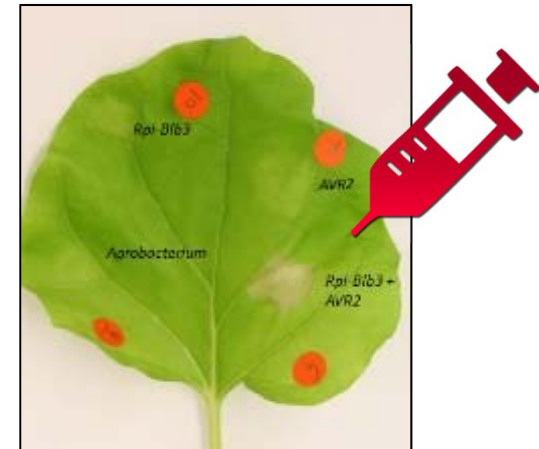
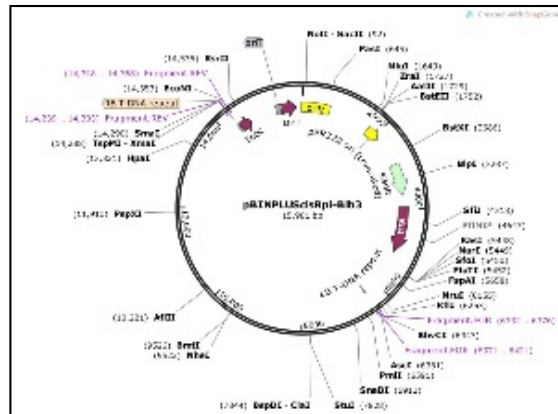




# Approche cisgénique - méthodologie

Identification de gènes de résistance (espèces sauvages de *Solanum*: *S. bulbocastanum*, *Rpi-Blb3* et *S. pinnatisectum*, *SpinaR2*), clonage et analyse fonctionnelle par la méthode d'agro-infiltration avec AVR2:

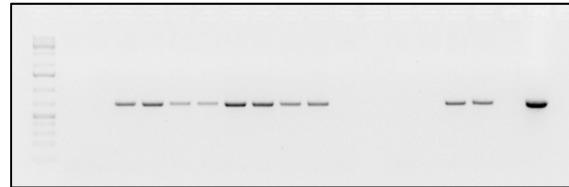
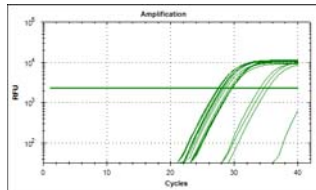
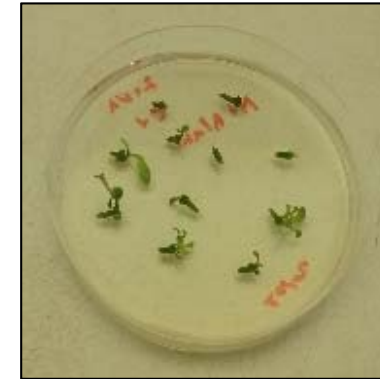
1.



# Approche cisgénique - méthodologie

Transformation génétique de la pomme de terre par *Agrobacterium tumefaciens*: variétés **Lady Rosetta**, **Louisa**, **Charlotte**, **Mont Blanc** avec *Rpi-Blb3*

2.



Sélection de clones cisgéniques et analyse moléculaire (nombre de copies, expression, insertion dans le génome)

# Approche cisgénique - méthodologie

Transformation génétique de la pomme de terre par *Agrobacterium tumefaciens*: variétés Lady Rosetta, Louisa, Charlotte, Mont Blanc avec *Rpi-Blb3*

2.

Inserted <i>R</i> gene	Variety	Explants	Shoots	<i>Rpi-Blb3</i> PCR +	Transformation frequency (%)	Vector free	Vector free (%)
<i>Rpi-Blb3</i>	Lady Rosetta	600	486	15	3.1	9	60
<i>Rpi-Blb3</i>	07-10-123 'Louisa'	200	151	nd	nd	nd	nd
<i>Rpi-Blb3</i>	Charlotte	200	114	3	2.6	2	66
<i>Rpi-Blb3</i>	Mont Blanc	200	x	x	x	x	x

# Approche cisgénique - méthodologie

2.

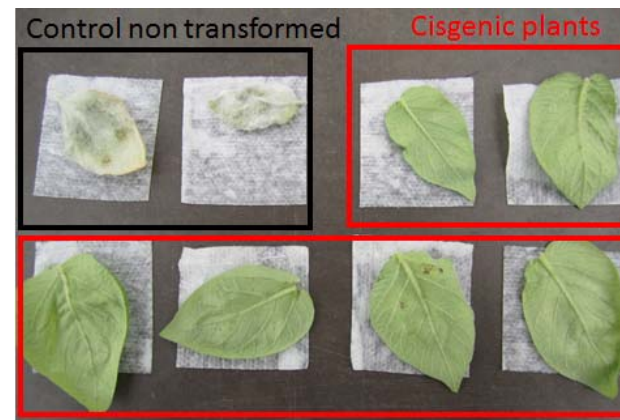
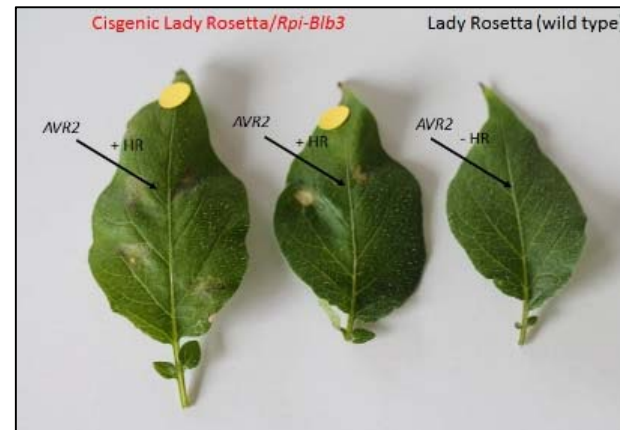
Cisgenic lines	Primer pairs amplifying the vector backbone					
	<i>tetA</i>	<i>trfA</i>	<i>nptIII</i>	<i>ColE1</i>	<i>oriV</i>	<i>traJ</i>
LaRo 5	-	-	-	-	-	-
LaRo 13	-	-	-	-	-	-
LaRo 15-1-10	-	-	-	-	-	-
LaRo 34	-	-	-	-	-	-
LaRo 52	-	-	-	-	-	-
LaRo 16	-	-	-	-	-	-
LaRo 2-b-52	-	-	-	-	-	-
LaRo 15-1-9	-	-	-	-	-	-
LaRo 2b-1-102	-	-	-	-	-	-
LaRo 114	-	-	-	-	-	+
LaRo 2c-151	+	-	-	-	-	-
LaRo 2d-134	-	-	-	-	-	+
LaRo 211	-	-	-	-	-	+
LaRo 241	+	-	-	+	+	+
LaRo 373	-	-	-	-	-	+
LaRo control	-	-	-	-	-	-
CH 4	-	-	-	-	-	-
CH 6	-	-	-	-	-	-
CH control	-	-	-	-	-	-



## Approche cisgénique - méthodologie

Acclimatation en serre des clones cisgéniques (*Rpi-Blb3*) et test sur feuilles détachées avec différent *P. infestans* (1\_A1; 13\_A2; 6\_A1) et par agro-infiltration avec AVR2.

3.



# Approche cispénique - méthodologie

Clones cispéniques « true-to-type »

4.



# Approche cisgénique - méthodologie

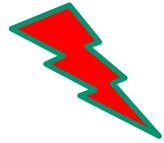
- ADN-T (~ 50 paires de bases) avec gène d'intérêt de l'espèce sauvage intégré dans le génome de pomme de terre

Bordure gauche (25 paires de bases)    **gène d'intérêt**    Bordure droite (25 paires de bases)

**tggcaggatatattgtggtgtaaac** NNNNNNNNNN **tgacaggatatattggcgggtaaac**



Pomme de terre cisgénique



Un exemple d'une culture vivrière naturellement transgénique:

291 accessions de la patate douce cultivée testées contiennent un ou plusieurs *ADN* de transfert (*ADN-T*) (Kindt *et al.* 2015)



## The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop

Tina Kyndt<sup>a,1</sup>, Dora Quispe<sup>a,b,1</sup>, Hong Zhai<sup>c</sup>, Robert Jarret<sup>d</sup>, Marc Ghislain<sup>b</sup>, Qingchang Liu<sup>c</sup>, Godelieve Gheysen<sup>a</sup>, and Jan F. Kreuze<sup>b,2</sup>

<sup>a</sup>Department of Molecular Biotechnology, Ghent University, 9000 Ghent, Belgium; <sup>b</sup>International Potato Center, Lima 12, Peru; <sup>c</sup>Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement/Laboratory of Crop Heterosis and Utilization, Ministry of Education, China Agricultural University, Beijing, China, 100193; and <sup>d</sup>Plant Genetic Resources Unit, US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Griffin, GA 30223

Edited by Eugene W. Nester, University of Washington, Seattle, WA, and approved March 16, 2015 (received for review October 13, 2014)

*Agrobacterium rhizogenes* and *Agrobacterium tumefaciens* are Crown gall is a disease that afflicts orchards and vineyards in

## Avantages:

- Plus rapide pour la création variétale par rapport à la sélection classique.
- Certaines espèces végétales sont difficiles à multiplier et la cisgénèse peut contribuer à accélérer la sélection végétale.
- Le transfert de gène en une seule étape sans transfert de gènes indésirables.
- Uniquement les allèles désirables sont insérés.
- Pas de risque sur les organismes non visés.



## Limites:

- En raison de l'absence de marqueur de sélection, l'obtention et le criblage d'un grand nombre de plantules régénérées sont absolument nécessaires pour identifier des événements cisgéniques.
- Le niveau de transformation est très faible.
- La transformation de variétés commerciales demande la mise au point de protocole optimisé pour chaque variété et la régénération de plantes demande plusieurs mois.
- La disponibilité des gènes et de l'effet de position.

# Approche cisgénique - conclusions

- développement d'un « pipeline » pour l'amélioration de la résistance au mildiou par la cisgénèse;
- développement de méthode pour caractérisation moléculaire et fonctionnelle, en laboratoire et en serre;
- utilisation de gènes de résistance directement à partir des espèces sauvages de *Solanum*;
- développement de clones cisgéniques.

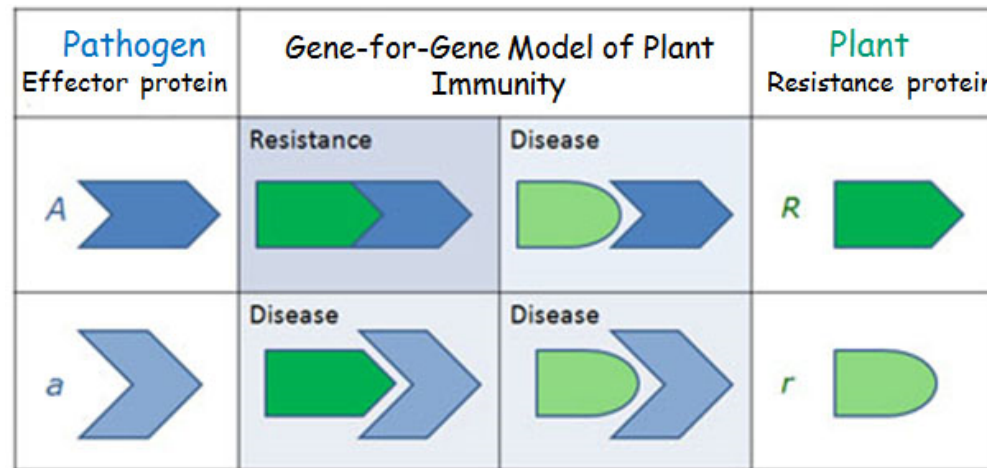
## II. Ingénierie génétique de précision pour l'amélioration des plantes



# Interaction plante-pathogène

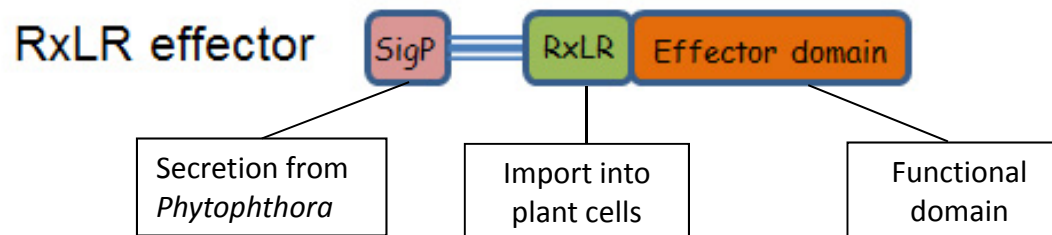
## ➤ Interaction gène-pour-gène:

- *P. infestans* - gènes *avr*
- La pomme de terre peut avoir des gènes *R*

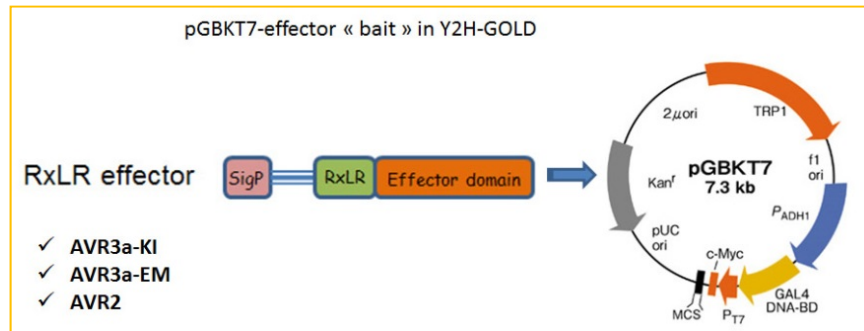


# Interaction plante-pathogène

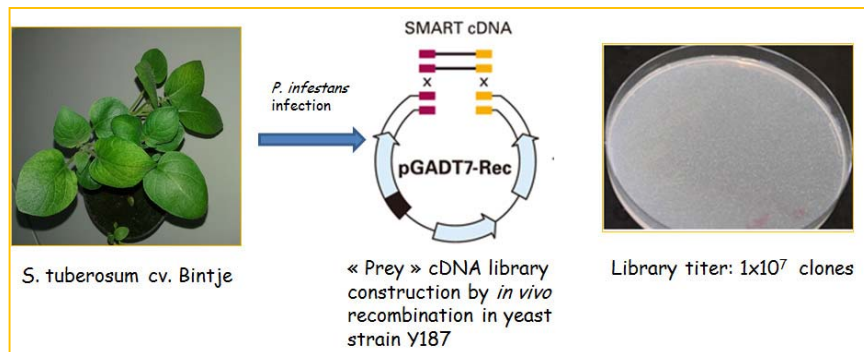
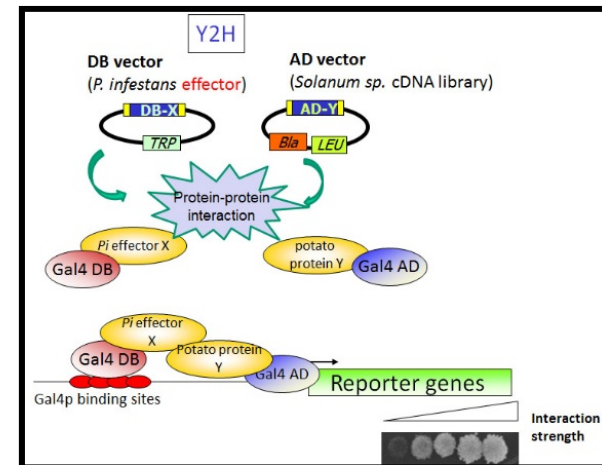
- Effecteurs- molécules sécrétées par le pathogène afin de désactiver le système de défense de l'hôte
  - **CRINKLER**- cytoplasmic; highly diverse, > 400 aa
  - **Enzyme inhibitors** – apoplastic; serine protease inhibitors, cystatin-like protease inhibitors, glucanase inhibitors...
  - **Hydrolitic enzymes**– apoplastic; several classes of proteases, and cell wall degrading enzymes
  - **RxLR family**- cytoplasmic; highly diverse and fast evolving, < 350 aa (> 500 effector molecules predicted in *P. infestans* genome; AVR3a, ipiO1, AVRBlb2...)



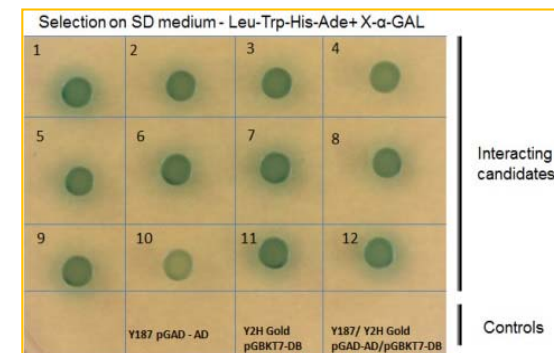
➤ *Phytophthora infestans* RxLR effecteur AVR3a interagit avec les protéines de la pomme de terre: approche « Yeast-two-Hybrid »



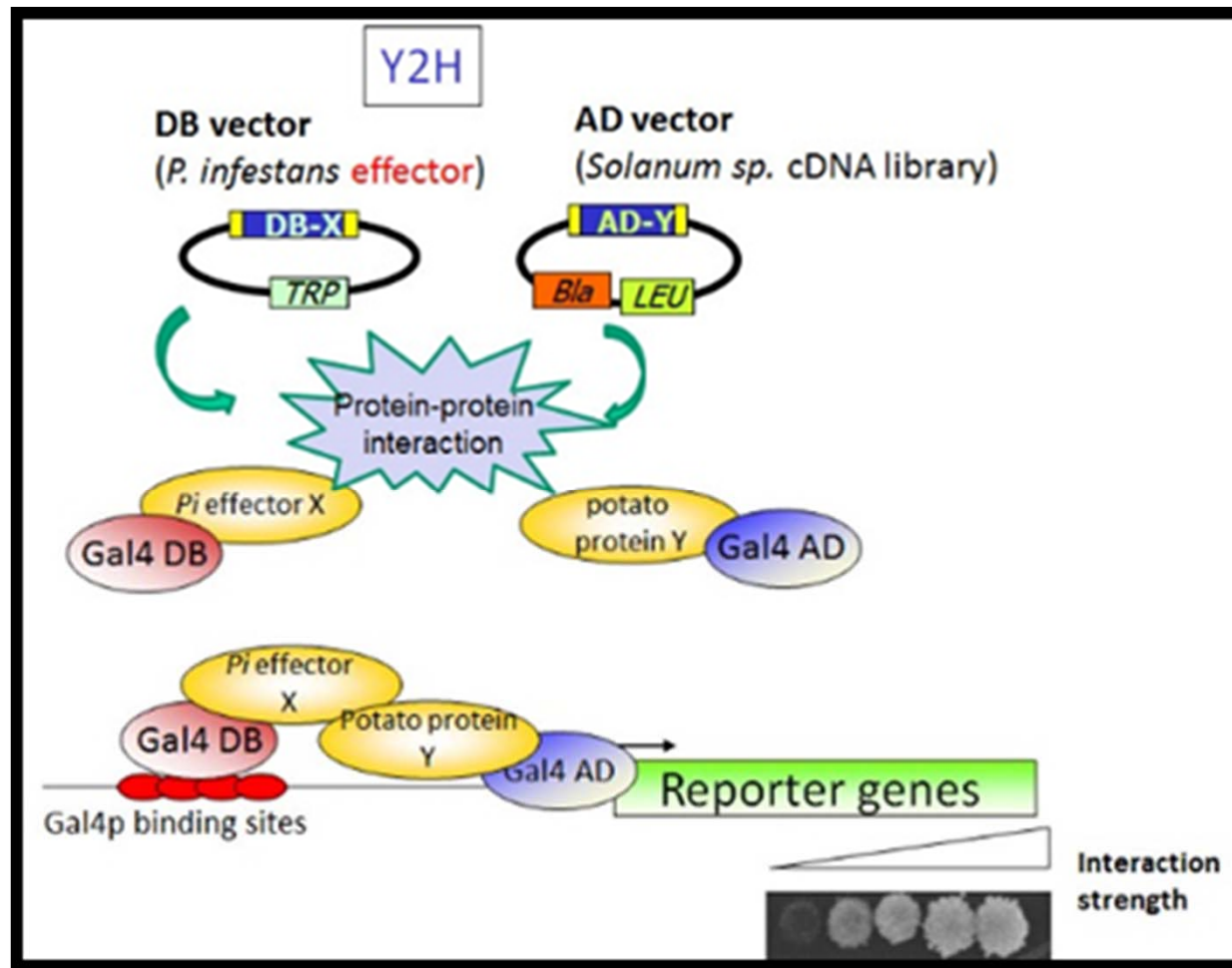
## Yeast mating



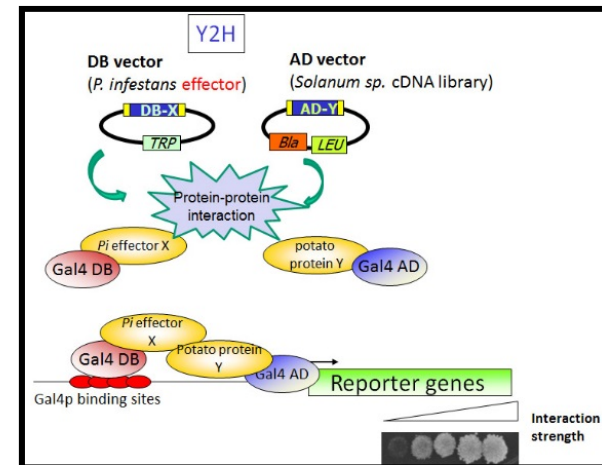
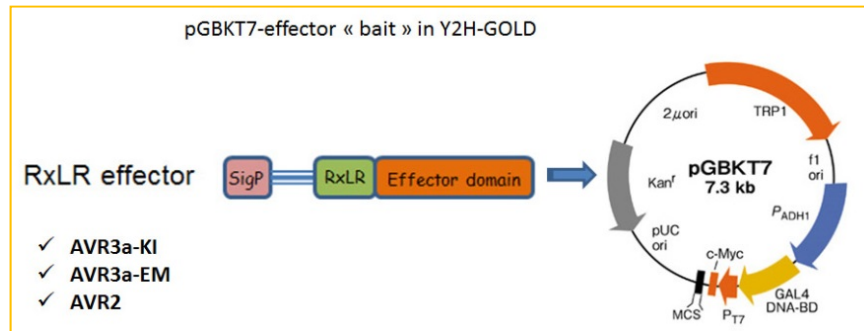
- Sélection
- Séquençage
- Identification



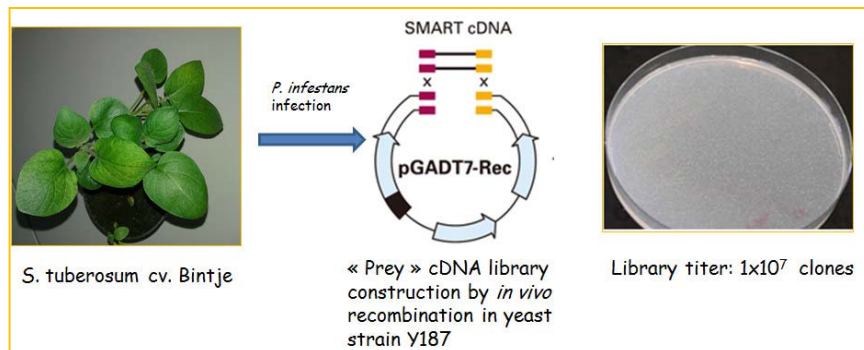
## « Yeast-two-Hybrid »



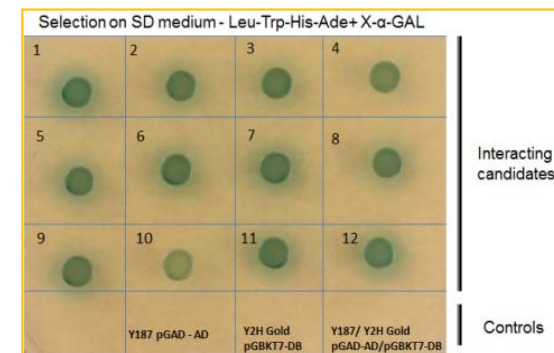
➤ *Phytophthora infestans* RxLR effecteur AVR3a interagit avec les protéines de la pomme de terre: approche « Yeast-two-Hybrid »



## Yeast mating



- Sélection
- Séquençage
- Identification



- *Phytophthora infestans* RxLR effecteur AVR3a interagit avec les protéines de la pomme de terre: approche « yeast-two-hybrid »

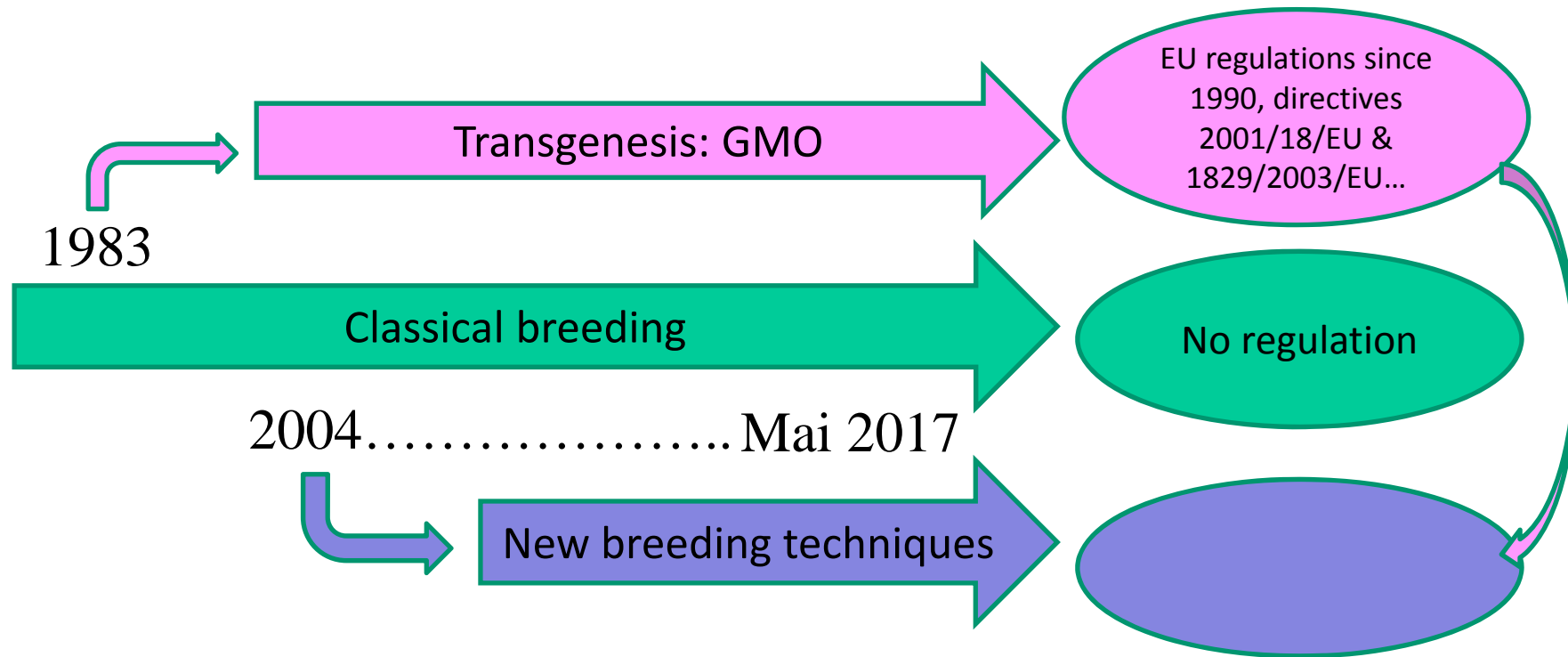
Annotation
Chloroplast Mg-stabilizing protein ( <i>S. tuberosum</i> )
Peroxidase N1-like ( <i>S. tuberosum</i> )
33 kDa precursor protein of oxygen evolving complex ( <i>S. lycopersicum</i> )
CONSTANS interacting protein 3 (CIP3) ( <i>S. lycopersicum</i> )
Geranylgeranyl diphosphate reductase ( <i>S. tuberosum</i> )
EF-1A protein ( <i>S. chacoense</i> )
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase ( <i>S. tuberosum</i> )
Uncharacterized protein ( <i>S. tuberosum</i> )
FKBP-type peptidyl cis-trans isomerase ( <i>P. infestans</i> )

- application dans l'édition du génome (*CS1*, *OEC1*, *EF1A*, *Per N1*)
- identification et application de gènes de susceptibilité (S) pour améliorer la résistance comme l'alternative des gènes R



# GMO legislation

- Directives 2001/18/EU et 2009/41/EU



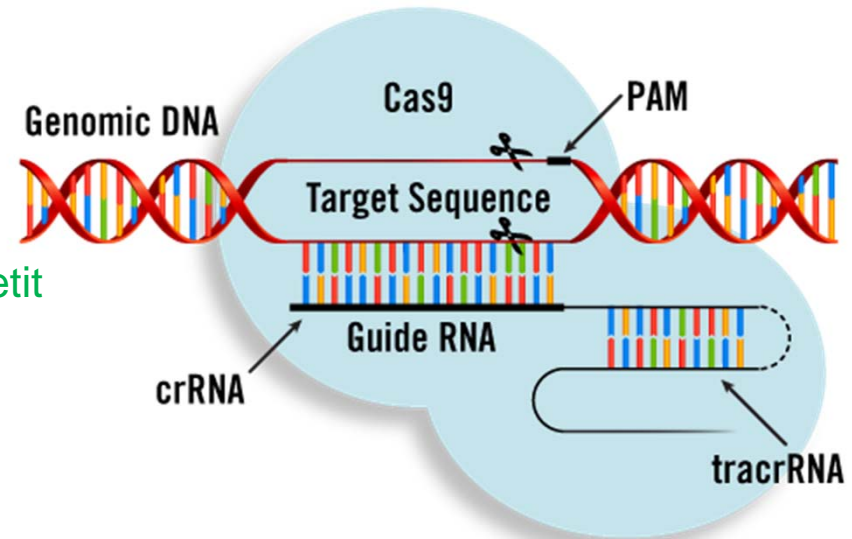
# « New Plant Breeding Techniques, NBT »

- **Cisgenesis**, Intragenesis, Agro-infiltration
- Oligonucleotide Directed Mutagenesis
- Zinc Finger Nucleases
- RNA-dependent DNA methylation (RdDM)
- Transcription activator-like effector nucleases (TALEN)
- **CRISPR/Cas9**: clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated protein (Cas)



## « Site directed nucleases, SDN »; CRISPR/Cas9

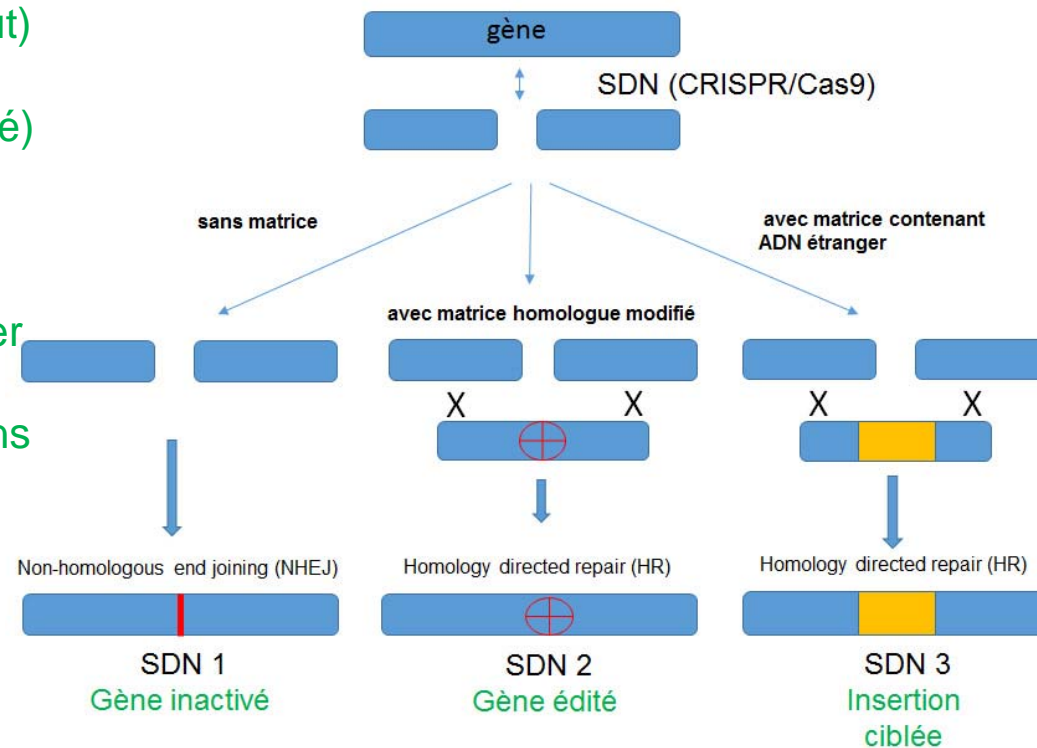
- Clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated protein 9 (Cas), *Streptococcus pyogenes*
- Formation d'un complexe entre Cas9 et un petit ARN conçu pour être homologue à un site unique du génome
- Reconnaissance de la cible dans le génome
- Coupure des deux brins de l'ADN chromosomique
- Réparation- 4 types de produits possibles



biology.stackexchange.com/

# « Site directed nucleases, SDN »; CRISPR/Cas9

- Réparation parfaite
- SDN1 (sans matrice)
  - perte de fonction de gène (knockout)
- SDN2 (en présence d'un gène modifié)
  - édition de gène à une ou plusieurs position (knockin)
- SDN3 (en présence d'un ADN étranger entre extrémités homologues)
  - insertion ciblée d'un transgène dans le génome (knockin)



## « Site directed nucleases, SDN »; CRISPR/Cas9

### ❑ Edition vs sélection génomique

- ✓ Vitesse - peu de générations
- ✓ Précision - introgression limitée au gène d'intérêt

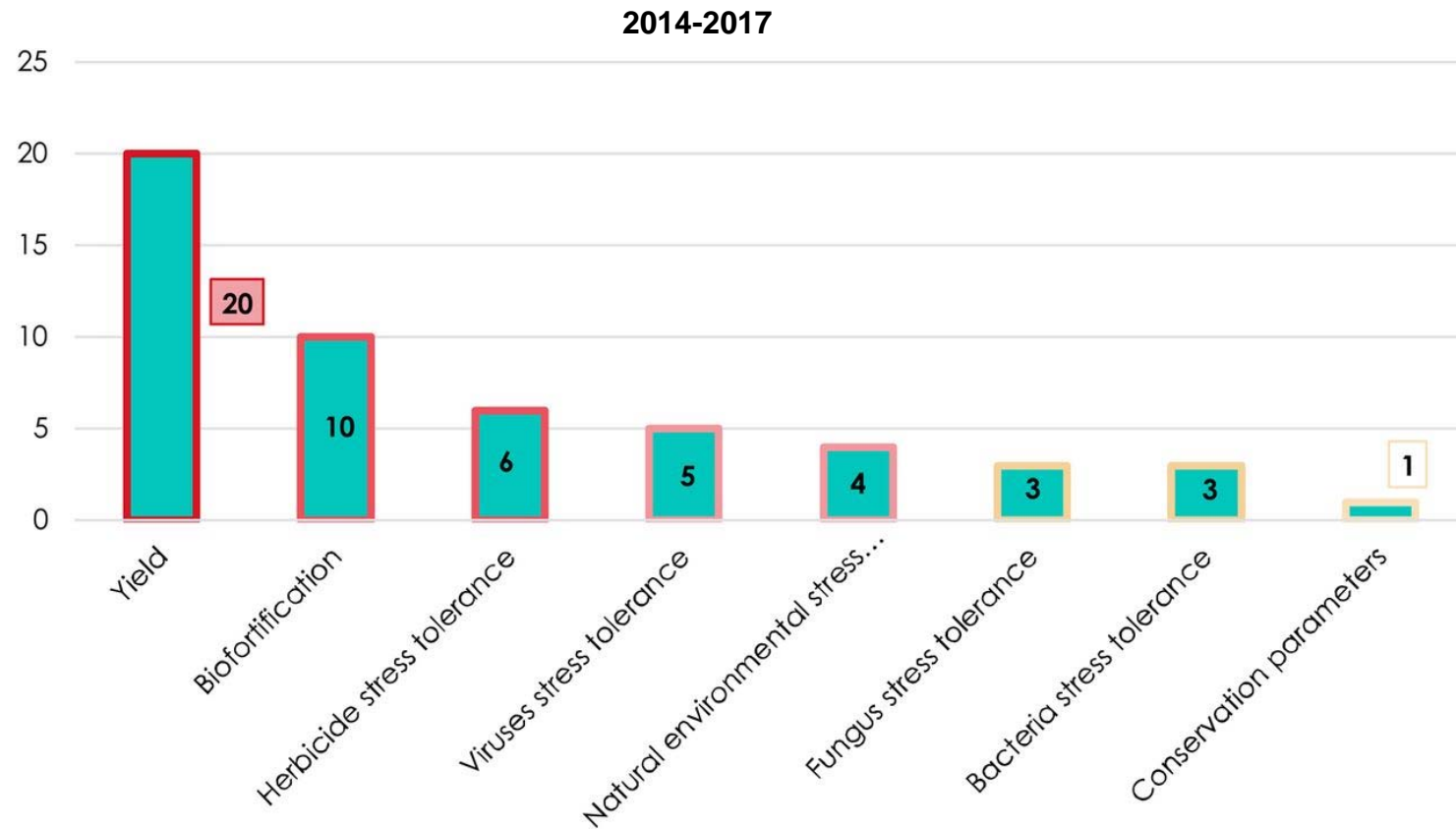
### ❑ Edition vs mutagenèse

- ✓ Vitesse - peu de générations
- ✓ Précision – modifications prédéterminées; modifications multiples; peu ou pas de modifications ailleurs dans le génome (« off site activity »)

### ❑ Edition vs transgénèse

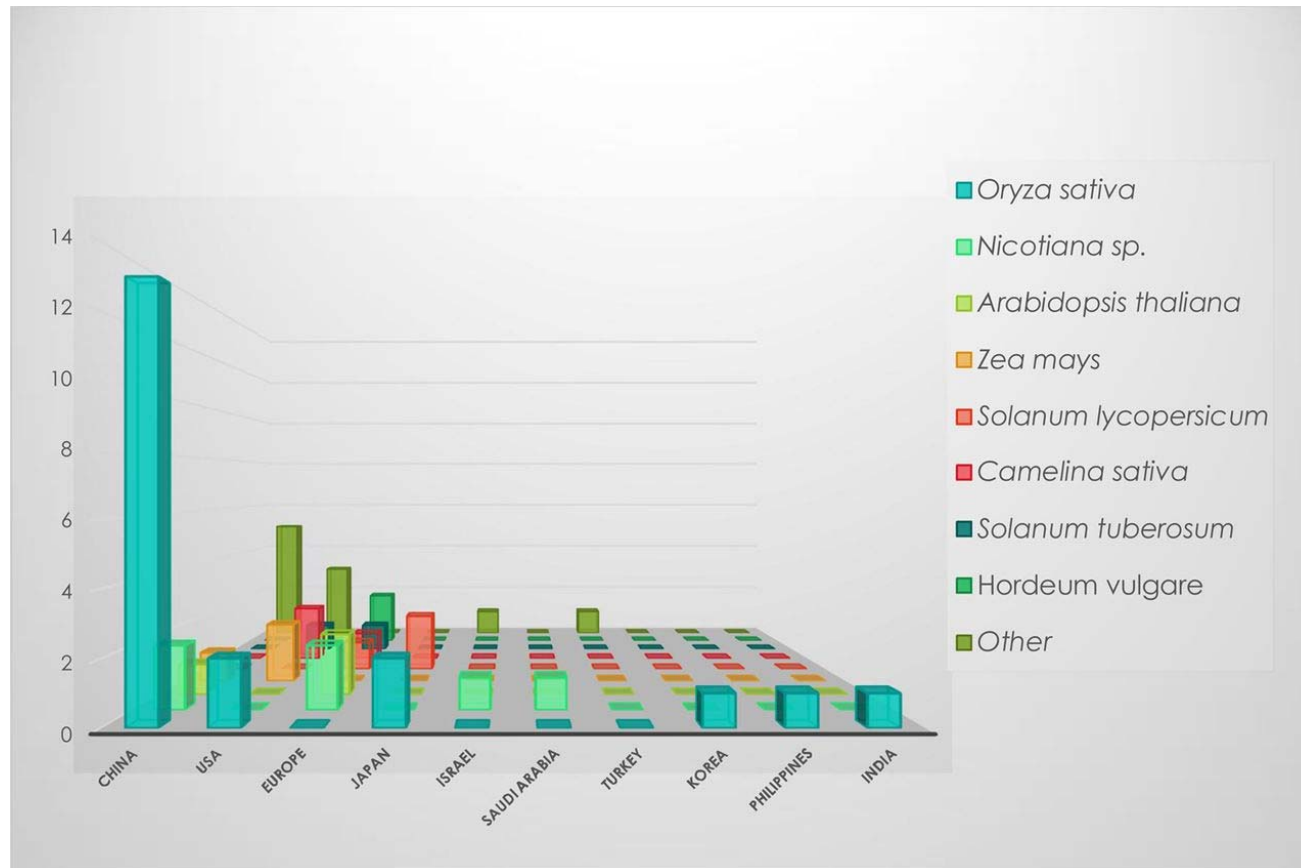
- ✓ Précision – intervention directe sur le gène d'intérêt; absence d'ADN supplémentaire

# CRISPR/Cas9 pour quels **traits** agronomiques?



Ricroch et al. 2017 *Emerging Topics in Life Sciences*

# CRISPR/Cas9 pour quels espèces?

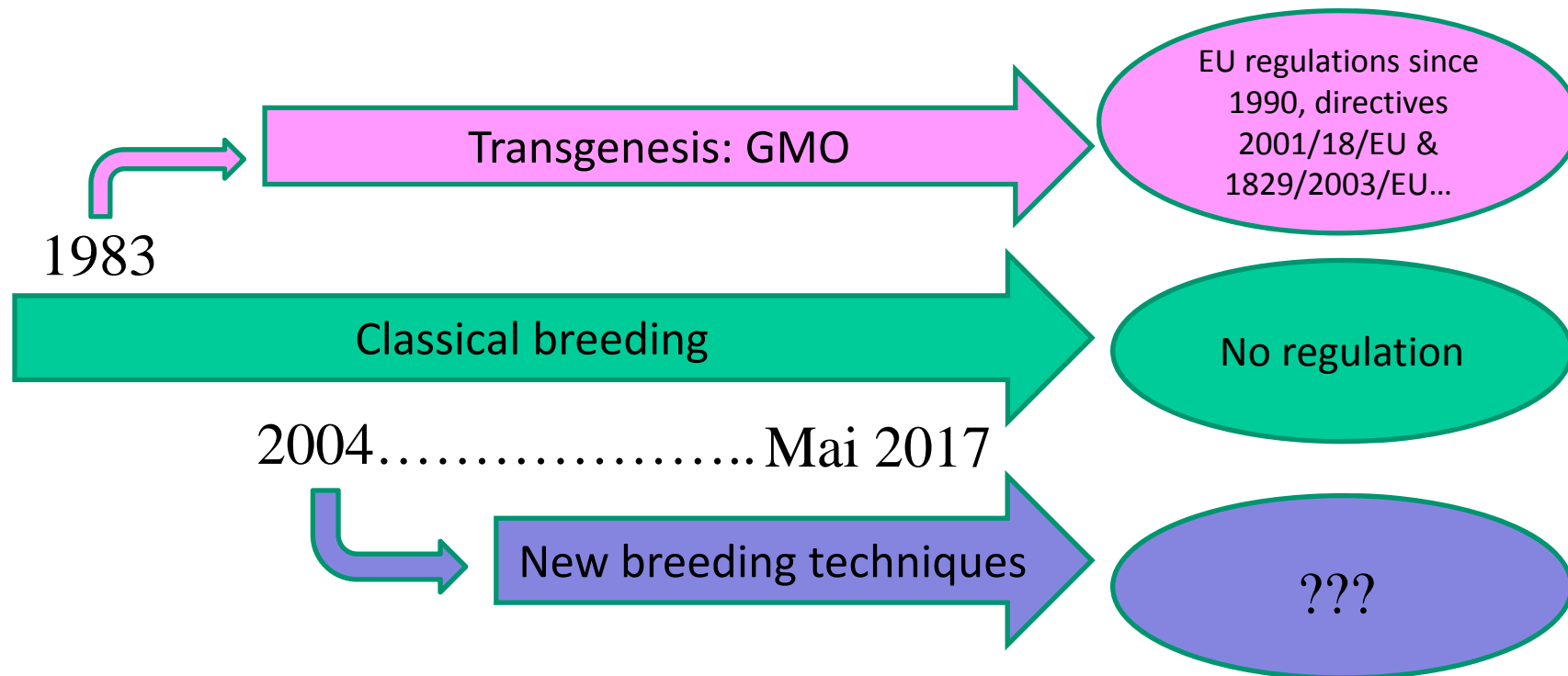


Ricroch et al. 2017 *Emerging Topics in Life Sciences*

# CRISPR/Cas9: conclusion

- Limites: connaissances et technicité
- Réglementation européenne
- Promesses: vitesse et précision

# GMO legislation



- La législation actuelle sur les OGM n'est pas adaptée au développement rapide de la biotechnologie végétale

# Merci pour votre attention