
FICHE NOUVELLES TECHNIQUES

CISGENÈSE / INTRAGENÈSE

Présentation générale de la technique (Grand public)

Les termes de cisgenèse et d'intragenèse caractérisent l'origine des séquences du transgène introduit dans la plante, quelle que soit la technique utilisée (transgenèse classique ou SDN3).

La cisgenèse correspond à l'utilisation d'un transgène qui provient intégralement et sans réarrangements de la même espèce ou d'une espèce sexuellement compatible. Le transgène, dans la définition utilisée ici peut être constitué de la partie codante d'un gène seulement ou du gène entier, comprenant ses séquences de régulation (Holme et al., 2013). Des séquences régulatrices d'expression peuvent cependant être apportées volontairement ou non par le site d'insertion du transgène, modifiant ainsi le site et le niveau d'expression du transgène.

L'intragenèse correspond à l'utilisation d'un transgène assemblé hors de la plante à partir de séquences issues de la même espèce ou d'espèces sexuellement compatibles. Il peut par exemple associer la séquence régulatrice d'un gène avec la séquence codante d'un autre gène et porter les séquences terminales non traduites (3'UTR) de l'ARN messager d'un troisième gène. Il peut aussi exprimer un ARN anti-sens, un ARN double-sens (épingle à cheveux) ou un micro-ARN ciblant un ou plusieurs gènes de la plante de façon à inhiber l'expression du gène endogène.

Dans tous les cas, la vectorisation du transgène et la sélection de l'événement souhaité sont indispensables.

Les objectifs recherchés sont, par exemple :

- l'introduction d'allèles d'un gène (d'une autre variété ou d'une espèce voisine par exemple) conférant une résistance à une maladie alors que l'allèle de la plante cultivée ne la présente pas.
- la surexpression ou sous-expression d'un gène par changement de son promoteur.
- l'expression d'un gène anti-sens pour inhiber l'expression d'un gène.

Principe et fonctionnement au niveau cellulaire et moléculaire.

Une plante cisgénique peut comporter plusieurs cisgènes, mais ne comporte en aucun cas de séquences génétiques étrangères à la plante ou à une plante sexuellement compatible. Aucun gène marqueur n'est présent dans une plante cisgénique. Cependant dans le cas d'un transfert de gène *via Agrobacterium tumefaciens*, les bordures de l'ADN-T peuvent être intégrées dans la plante, sans que le statut de cisgène ne soit à reconsidérer.

Lorsque produites par des techniques non ciblées, la cisgenèse et l'intragenèse peuvent mener à une interruption d'ORF (*Open Reading frame / cadre de lecture ouvert*) existantes ou à la création de nouvelles ORF, du fait de l'insertion aléatoire du gène dans le génome de la plante.

Pour générer une plante cisgénique ou intragénique, les mêmes méthodes que celles décrites pour la transgenèse peuvent être utilisées pour transférer le gène.

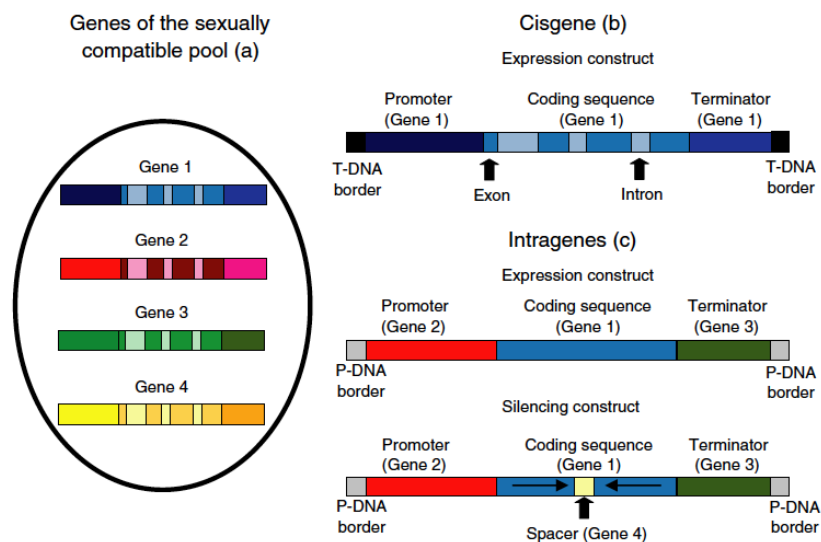


Figure 1 : Illustration des constructions génétiques utilisables pour la cisgenèse et l'intragenèse¹.

Le cisgène est une copie identique à un gène provenant d'un pool de gènes d'espèces sexuellement compatibles (a), incluant promoteur, introns, terminateur (b). Lorsque *Agrobacterium tumefaciens* est utilisée pour la transformation génétique, le cisgène est inséré dans le génome de la plante avec les bordures de l'ADN-T. L'intragenèse (c) permet une recombinaison *in vitro* d'éléments isolés de différents gènes d'un pool de gènes d'espèces sexuellement compatibles (a). Les introns ne sont pas forcément requis : l'ADNc ou simplement des fragments de gènes peuvent être utilisés. Des constructions permettant l'expression d'un gène ou l'extinction d'un gène peuvent être développées. D'après Rommens (2004)², l'intragène doit être inséré entre des bordures ayant le même rôle que les frontières de l'ADN-T mais isolées d'ADN d'espèces sexuellement compatibles (P-DNA), quand la transformation *via Agrobacterium tumefaciens* est utilisée.

¹ Holme I.B., Wendt T., Holm P.B. (2013) Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnol. J.* 11(4), 395–407.

² Rommens, C.M. (2004). All-native DNA transformation: a new approach to plant genetic engineering. *Trends in Plant Science*, 9(9), 457-464.

Utilisations possibles

Des gènes de résistance à des maladies comme le mildiou ont été repérés dans des variétés sauvages de pomme de terre, de fraises ou de raisin et ont pu être introduits dans des variétés cultivées sensibles à cette maladie.

D'autres applications sont développées, comme la modification des teneurs en amylopectine (peupliers, pommes de terre) ou en phytase (orge). La surexpression d'un gène ou son inactivation par cisgénèse peut également améliorer la tolérance à la sécheresse ou des caractéristiques qualitatives (qualité boulangère du blé).

Modalités de mise en œuvre

Le vecteur le plus couramment utilisé pour la cisgénèse ou l'intragenèse végétale est le vecteur bactérien *Agrobacterium tumefaciens* désarmé (voir fiche Transgénèse). D'autres méthodes sont utilisées pour transférer l'ADN dans la cellule végétale, par exemple la biolistique (introduction d'ADN adsorbé sur des microbilles d'or), ou l'introduction mécanique d'ADN dans des protoplastes (cellule végétale sans paroi pectocellulosique) nécessitant l'action d'un agent chimique (par exemple le PolyEthylene Glycol (PEG), polymère qui déstabilise de façon réversible les membranes plasmiques, permettant ainsi le transfert de l'ADN au travers de la membrane) ou d'un champ électrique (électroporation).

Avantages et contraintes par rapport aux techniques existantes

La cisgénèse permet d'accélérer de façon significative la création d'une nouvelle variété par rapport à l'amélioration végétale conventionnelle, en particulier pour des plantes comme la pomme de terre ou le pommier. En effet, une nouvelle variété peut être développée en 5 ans environ en utilisant la cisgénèse alors que cela peut prendre jusqu'à 25 ans ou plus par les méthodes conventionnelles d'amélioration génétique, ceci du fait de certains gènes non désirés qui sont introgressés avec le gène que l'on souhaite sélectionner et qui doivent être éliminés par rétrocroisements successifs avec la variété parentale élite.

Détection

Intragenèse

La modification est-elle détectable dans les plantes porteuses de la modification et leurs produits ?

L'intragenèse se caractérise par l'utilisation d'un transgène composé de plusieurs éléments génétiques d'origine diverse, mais provenant tous d'espèces sexuellement compatibles avec la plante modifiée.

Si la modification génétique est documentée, les événements d'intragenèse sont traçables par des méthodes de séquençage ou de PCR. Suivant les constructions et comme pour les OGM actuels, on utilisera préférentiellement soit les fragments de bordure soit les construits spécifiques permettant de détecter les séquences du transgène et/ou son point d'insertion dans le génome (Figure 3).

Peut-on identifier la modification et la technique ayant donné lieu à la cette modification dans la plante porteuse de la modification et ses produits ?

Sans documentation de la modification, il est possible dans certains cas, même si en pratique cela peut être compliqué, de différencier une plante présentant un évènement d'intragenèse d'une plante obtenue par sélection classique.

L'intragenèse se caractérise par l'utilisation d'un transgène composé de plusieurs éléments génétiques provenant de différents gènes d'espèces proches de la plante modifiée. Cette juxtaposition est très improbable naturellement et constitue donc une preuve de modification dirigée, d'autant plus si certains des éléments sont d'intérêt agronomique connu ou d'utilisation courante. Une situation favorable à l'identification serait par exemple le cas où, par séquençage, des combinaisons de fragments du transgène comprenant des outils moléculaires employés communément (par exemple un promoteur d'un gène suivi de la partie codante d'un gène de résistance ou d'une partie placée en sens inverse de la transcription normale pour inactiver l'expression d'un gène) sont trouvés. La difficulté est alors de montrer que cette combinaison n'existe pas dans la nature, étant donné que les génomes de plantes évoluent largement au sein d'une espèce par perte et gain de fragments. Il faudrait en principe connaître le génome entier de nombreuses (toutes) les variétés de l'espèce pour établir l'absence naturelle de cette combinaison. Dans le futur, l'étude de la nature et de l'environnement génique de l'insertion, pour les organismes dont la séquence est connue, permettra peut-être de mesurer la probabilité de présence "naturelle" d'une combinaison et d'identifier des cas d'intragenèse avec une relative certitude.

Dans le cas où l'intragenèse a été obtenue via *Agrobacterium* plutôt que par bombardement ou par SDN3, la présence des bordures de l'ADN-T peut être aussi utilisée. Celles-ci ne sont pas nécessairement intactes ni même présentes dans les plantes et il est aussi possible que des régions homologues aux frontières droite et gauche de l'ADN-T soient présentes naturellement dans la plante ce qui produirait de faux positifs. Pour les plantes présentant un évènement d'intragenèse obtenue par transgenèse via bombardement ou SDN3 sans utilisation d'agrobactéries, ce type de preuve serait absent

La documentation de l'insertion permet de rendre cette identification plus fiable et accessible.

Si une détection est possible, est-elle applicable dans le cadre d'une recherche de présence fortuite en situation de mélange plus ou moins complexe au cours du processus de production, de transformation et de distribution ?

Dans le cadre d'une modification décrite et connue dans les banques de données, ne serait-ce que par un seul de ces éléments, il est possible de détecter par des méthodes simples et peu coûteuses la bactérie elle-même par des méthodes de marche sur le chromosome telles que la PCR inverse ou la PCR après ligation d'adaptateurs (ligation-mediated PCR), etc. (Arulandhu et al., 2016).

Il est théoriquement possible sur une présence fortuite, d'en déterminer l'origine en absence de description de la modification. Cependant, cette identification est à l'heure actuelle coûteuse et difficile à mettre en œuvre en condition de routine sur un matériel issu de mélange.

Cisgénèse

La modification est-elle détectable dans les plantes porteuses de la modification et leurs produits ?

Si la modification génétique est documentée, les événements de cisgénèse sont traçables par des méthodes de séquençage ou de PCR, en particulier si le contexte génomique de l'insertion est connu. Suivant les constructions et comme pour les OGM actuels, on utilisera préférentiellement soit les fragments de bordure soit les construits spécifiques (figure 3).

Peut-on identifier la modification et la technique ayant donné lieu à cette modification dans la plante porteuse de la modification et ses produits ?

Sans documentation de la modification, il est possible mais encore plus difficile que pour l'intragenèse de différencier une plante présentant un événement de cisgénèse d'une plante obtenue par sélection classique. En effet, la cisgénèse se caractérise par l'utilisation d'un transgène d'origine unique et éventuellement par la présence des deux extrémités du plasmide Ti en cas de vectorisation par *Agrobacterium*. La juxtaposition de ces deux éléments est relativement improbable naturellement mais cependant plus probable que pour l'intragenèse. Il est théoriquement possible de différencier une plante présentant un événement de cisgénèse obtenue par transgénèse via *Agrobacterium* d'une plante obtenue par sélection classique, en utilisant la présence des frontières de l'ADN-T (mais celles-ci ne sont pas nécessairement entières ni même présentes). Pour les plantes présentant un événement de cisgénèse obtenu par transgénèse via transformation directe (bombardement, transformation de protoplastes, ...) ou SDN3, l'étude de l'environnement génique de cette insertion pour les organismes dont la séquence est connue et la nature de l'insertion permettraient dans certains cas de statuer sur la technique avec une relative certitude.

La description documentaire de la modification permet de rendre cette identification plus fiable et accessible par l'identification du contexte génomique de l'insertion.

Si une détection est possible, est-elle applicable dans le cadre d'une recherche de présence fortuite en situation de mélange plus ou moins complexe au cours du processus de production, de transformation et de distribution ?

Dans le cadre d'une modification décrite et connue il est possible de détecter par des méthodes simples et peu coûteuses (PCR, séquençage, marqueurs moléculaires...) La présence du transgène dans la plupart des cas. Il peut cependant parfois apparaître des résultats de type « faux positifs » lorsque le transgène suspecté est en réalité présent naturellement dans la variété testée.

Il est théoriquement possible sur une présence fortuite, d'en déterminer l'origine en absence de description de la modification. Cependant, cette identification est à l'heure actuelle coûteuse et difficile à mettre en œuvre en condition de routine sur un matériel issu de mélange.

Bibliographie

Arulandhu, A.J., van Dijk, J.P., Dobnik, D., Holst-Jensen, A., Shi, J., Zel, J., and Kok, E.J. (2016). DNA enrichment approaches to identify unauthorized genetically modified organisms (GMOs). *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 4575–4593.

Espinoza, C., Schlechter, R., Herrera, D., Torres, E., Serrano, A., Medina, C., Arce-Johnson, P. (2013). Cisgenesis and intragenesis: new tools for improving crops. *Biol Res*, 46(4):323-31.

Holme I.B., Wendt T., Holm P.B. (2013) Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnol. J.* 11(4), 395–407.

Holme, I.B., Dionisio, G., Brinch-Pedersen, H., Wendt, T., Madsen, C.K., Vincze, E., Holm, P.B. (2012). A Cisgenic Approach for Improving the Bioavailability of Phosphate in the Barley Grain. ISB news report.

Krens, F.A., Schaart JG, van der Burgh, A.M., Tinnenbroek-Capel, I.E.M., Groenwold, R., Kodde, L.P., Broggin, G.A.L., Gessler, C. and Schouten, H.J. (2015). Cisgenic apple trees; development, characterization, and performance. *Front. Plant Sci.* 6:286.

Rommens, C.M. (2004). All-native DNA transformation: a new approach to plant genetic engineering. *Trends in Plant Science*, 9(9), 457-464.