
FICHE NOUVELLES TECHNIQUES

MUTAGENÈSE DIRIGÉE PAR OLIGONUCLÉOTIDES

Présentation générale de la technique (Grand public)

Cette technique vise à l'introduction de mutations ponctuelles ciblées. Elle s'appuie sur l'utilisation d'une courte séquence d'acide nucléique quasi-identique à la séquence ciblée mais possédant la mutation recherchée. L'acide nucléique est introduit dans la cellule de l'hôte où, selon un mode mal connu, les mécanismes de réparation physiologiques de la cellule pourraient favoriser la substitution de la séquence du génome par celle de l'oligonucléotide. Les oligonucléotides ne s'intègrent pas dans le génome, leur présence n'est donc que transitoire¹.

Principe et fonctionnement au niveau cellulaire et moléculaire

La **mutagenèse dirigée par un oligonucléotide ou ODM** (pour oligonucleotide-directed mutagenesis) a pour but de modifier une à quelques bases d'un locus précis dans le génome ou d'imposer de manière ciblée une insertion ou une délétion de quelques nucléotides. Seule une matrice oligonucléotidique présentant la modification recherchée est introduite dans la cellule. Celle-ci va s'hybrider sur sa cible où les mésappariements des bases mutées sont résolus par la machinerie cellulaire ce qui, dans certains cas, aboutit à la modification des bases de l'ADN génomique et crée donc des mutations dans la cible. Ces mutations peuvent être identiques à celles présentées par la matrice initialement, mais elles peuvent également être différentes.

La matrice oligonucléotidique est généralement synthétisée chimiquement et introduite sous forme d'ADN ou d'ARN, le plus souvent associés sous forme d'hybrides « ADN-ARN » et modifiés afin d'être

¹ Les oligonucléotides modifiés chimiquement ne s'intègrent pas, pour les autres oligonucléotides, les événements d'intégration sont rarissimes et pourront être détectés par NGS.

plus stables et de présenter une plus grande affinité à l'ADN génomique. Cette matrice est ensuite répliquée en ADN par la cellule.

L'oligonucléotide est introduit par transformation de protoplastes, bombardement de microbilles (biolistique) ou électroporation (Kochevenko and Willmitzer, 2003).

Cette méthode étant peu efficace, un moyen de sélection fonctionnel est nécessaire pour isoler les cellules porteuses de l'événement souhaité.

Utilisations possibles

Ces techniques peuvent être utilisées pour introduire une mutation ponctuelle dans un organisme cible. Elles ne permettent pas l'introduction de séquences nucléiques nouvelles de grande taille. Les utilisations pratiques en amélioration des plantes peuvent donc être limitées. Par exemple, l'introduction de mutations en codon de type « STOP » permet l'extinction de gènes. Comme les autres techniques de recombinaison homologue, la technique peut être utilisée de façon efficace si elle est couplée à la recherche de SNP liés à des QTL.

Modalités de mise en œuvre

Le principe de cette technique repose sur l'introduction d'un oligonucléotide dans les cellules hôtes. De nombreuses molécules ou mélanges moléculaires sont en cours d'essais pour améliorer la vectorisation qui fonctionne relativement bien in vitro mais très peu sur des organismes entiers (Liang et al., 2002).

Avantages et contraintes par rapport aux techniques existantes

La fréquence de mutation reste très faible et assez variable en fonction de l'organisme utilisé. Chez les plantes, la fréquence de réparation est extrêmement variable. De plus, la fréquence de mutation spontanée de certaines plantes en particulier (tabac et colza) peut surestimer l'effet réel résultant de l'utilisation du RDO. En effet, chez ces plantes, un taux de réparation de l'ordre de 2×10^{-7} a été observé (extrêmement proche de la fréquence de mutation spontanée). Ce taux peut être augmenté d'un facteur 10 à 20 en fonction de l'état physiologique des cellules testées.

Cette technique peut être complétée par l'obtention de cassures simples brins sur l'ADN de façon aléatoire ou spécifique (cf ZFN, TALEN et CRISPR).

En conséquence, cette technique présente peu d'avantage par rapport aux techniques mettant en œuvre des nucléases (ZFN, TALEN, CRISPR...) qui sont plus fiables, plus efficaces et plus souples, si ce n'est son coût très faible, sa vectorisation simple.

Détection

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

Les techniques ODM induisent des mutations dans un gène endogène, mais les plantes obtenues n'ont pas de transgène complet ajouté.

Les mutations induites, **si elles sont décrites dans un document d'accompagnement**, peuvent être tracées phénotypiquement (plus ou moins facilement en fonction du type de phénotype) et/ou génétiquement. Avec une documentation de la modification il est donc possible de réaliser des tests de détection génétique à l'aide de techniques de biologie moléculaire facilement réalisables et basées sur la PCR ou des tests de détection phénotypiques (dans le cas de la modification d'un caractère).

Si ces mutations induites ne sont pas décrites, il est théoriquement possible d'observer la mutation par l'utilisation d'une technique de séquençage. Se pose alors la difficulté du choix de la séquence de comparaison. En effet entre deux plantes de la même variété, il existe de très nombreuses différences de séquences et il sera, en pratique, biologiquement impossible de différencier une mutation obtenue par ODM d'une mutation naturelle.

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

Avec une documentation de la modification il est possible et techniquement facile d'identifier la modification et éventuellement de l'associer à la technique.

Sans documentation de la modification et/ou de la méthode utilisée, il est difficile de différencier de manière systématique et parfaitement fiable, en l'état actuel, une plante obtenue par ODM d'une plante obtenue par des techniques de sélection (exploitant la variabilité naturelle ou induite par mutagenèse). Bien que la modification puisse parfois être elle-même identifiable si on la cherche, elle ne pourrait pas à l'heure actuelle être facilement imputée à l'emploi de l'une ou l'autre de ces techniques ou méthodes. Il est possible que des travaux de recherche sur les effets de diverses techniques, y compris de vectorisation, permettent dans le futur d'identifier la technique utilisée. Un faisceau de preuves découlant de la vectorisation et/ou des modifications génomiques et phénotypiques de la plante pourra alors fournir un cadre de décision.

Le lien entre la modification et la technique utilisée dans le cadre de l'analyse du produit s'inscrit dans cette même problématique si le produit contient de l'ADN et dans celle évoquée dans le cadre SDN3 si les produits ne contiennent pas d'ADN.

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 ?

S'il n'existe pas de déclaration de la modification, compte tenu de la difficulté d'identification de la technique expliquée plus haut dans le cas d'une plante donnée, il devient encore plus difficile voire totalement impossible dans le cas d'une présence fortuite éventuelle (donc à très faible taux), de

déterminer biologiquement de façon formelle l'origine du variant génétique (plante obtenue par SDN1/2/ODM ou variant naturel).

Si la modification génétique est déclarée et si l'objectif est de **détecter la présence** de cette modification, il est alors possible de développer des méthodes d'analyse de présence dans un ensemble (pool) de plantes ou de graines. Les techniques disponibles se basent sur le **séquençage** de la région du génome correspondante ou l'utilisation de marqueurs moléculaires spécifiques de la mutation. Dans le cas particulier de variétés rendues tolérantes à un herbicide, l'utilisation de l'herbicide sur un échantillon du champ mis en culture permet d'identifier la présence du trait. Ces méthodes pourraient alors être mises en place dans le cadre de recherche de présence fortuite.

Si la modification génétique est déclarée et si l'objectif est de **prouver une propriété intellectuelle éventuelle**, la situation est compliquée par le fait que ces mutations peuvent aussi être produites par d'autres méthodes (variants naturels, mutagenèse non dirigée).

La probabilité de co-occurrence des mêmes variants génétiques indépendamment par deux méthodes est liée au nombre et au type de mutations. Il faudrait dans ce cas établir des seuils de probabilité de co-occurrence pour chaque cas, ce qui serait très difficile à mettre en place. Dans un raisonnement similaire, l'environnement génétique autour de la mutation entre autres données pourrait être évalué pour qualifier une plante, mais dans l'état actuel des connaissances la preuve biologique de l'origine du variant resterait difficile à mettre en évidence.

Bibliographie

Kochevenko, A., and Willmitzer, L. (2003). Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-based site-specific modification of the tobacco acetolactate synthase gene. *Plant Physiol.* *132*, 174–184.

Liang, L., Liu, D.-P., and Liang, C.-C. (2002). Optimizing the delivery systems of chimeric RNA-DNA oligonucleotides: Beyond general oligonucleotide transfer. *Eur. J. Biochem.* *269*, 5753–5758.