

---

# FICHE NOUVELLES TECHNIQUES

## SÉGRÉGANTS NÉGATIFS

---

### Présentation générale de la technique (Grand public)

Lors de la production des gamètes, le patrimoine génétique des organismes à reproduction sexuée est « brassé », les chromosomes parentaux échantent du matériel, ce qui permet de produire des gamètes différents. De ce fait, lors du croisement mettant en œuvre un OGM il est possible d'obtenir dans la génération suivante des « individus » ne possédant pas le transgène. Ces individus sont dits « ségrégant négatifs ». Cette caractéristique peut être mise à profit pour éliminer le transgène d'une plante une fois que sa présence n'est plus requise pour le caractère recherché. Ceci permet donc d'obtenir des plantes non génétiquement modifiées, mais ayant le caractère recherché, à partir de plantes génétiquement modifiées. La technique repose sur la possibilité d'éliminer toute modification introduite par simple croisement suivi de sélections.

Un **ségrégant négatif** est donc un descendant non transgénique de croisement(s) ayant fait intervenir une plante génétiquement modifiée. La plante ne porte pas de transgène mais un de ses ascendant (une ou plusieurs générations en amont) portait un transgène.

### Principe et fonctionnement au niveau cellulaire et moléculaire

La méiose, lors de la formation des gamètes, permet un brassage des gènes de l'individu. Dans le cas d'un individu hétérozygote pour un transgène, sa descendance sera non porteuse de transgène, dans  $\frac{1}{4}$  des cas pour un croisement avec deux parents OGM porteurs du même événement de transformation et  $\frac{1}{2}$  pour le cas où un seul des parents est OGM. Cependant ces individus non transgéniques auront pu bénéficier de la présence transitoire du trait conféré par le transgène.

## Utilisations possibles

L'utilisation des ségréants négatifs peut permettre :

- la facilitation des croisements en utilisant des gènes de stérilité mâle (Pioneer seed production technology SPT)
- le reverse breeding
- la réduction du temps entre 2 générations en jouant sur le temps de floraison des arbres fruitiers (Yamagishi et al., 2014) ou d'ornement
- toute utilisation nécessitant de faire bénéficier les plantes parentales d'un trait non transmis à la descendance.

### SPT (seed production technique)

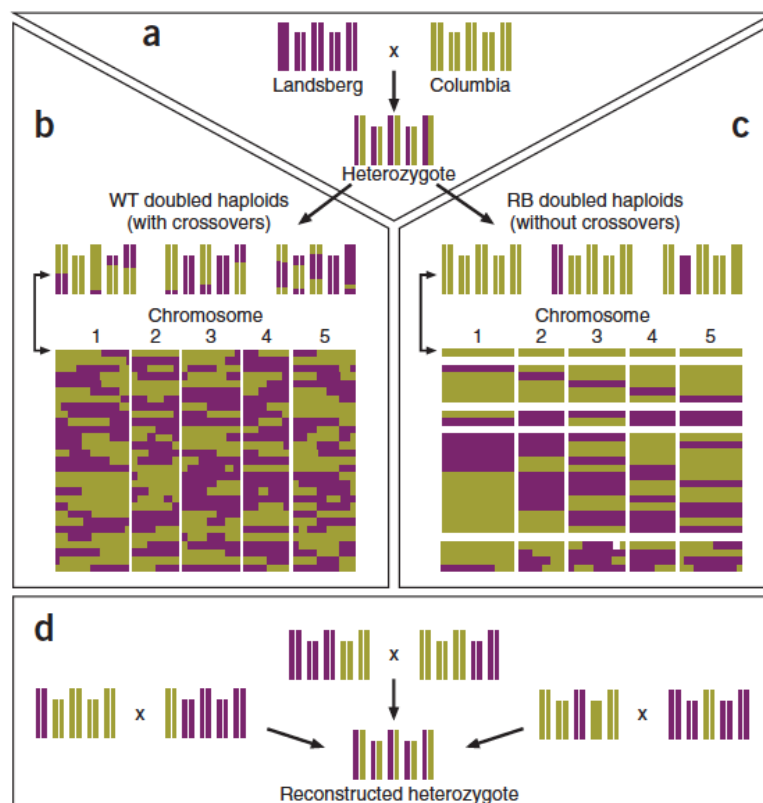
Cette technique vise à maintenir et multiplier par autofécondation une lignée de plante mâle stérile afin d'obtenir en seconde génération des plantes hybrides sans avoir recours à la castration physique de la plante. Elle s'appuie sur le maintien à l'état hétérozygote d'un gène restaurant la fertilité d'une lignée mâle stérile, lié à un gène conférant une perte de viabilité du pollen et un marqueur de transformation.

Par exemple, la technologie développée par la société Pioneer permet de multiplier par autofécondation des lignées de plantes mâles stériles mutées dans le gène Ms45 ( $ms45/ms45$ ). La fertilité du pollen est restaurée par l'expression de l'allèle sauvage du gène Ms45 dans un transgène contenant par ailleurs le gène codant une amylase spécifique des anthères ( $zm-aa1$ ) et un marqueur fluorescent (DsRed2). L'expression du gène  $Zm-aa1$  rend le pollen incapable de germer alors que le gène de fluorescence exprimé dans les graines permet d'identifier les graines porteuses du transgène. Cette lignée hétérozygote pour le transgène est appelée « GM maintenir ». La lignée peut ainsi être amplifiée par autofécondation en sélectionnant les graines colorées en rouges par l'expression du transgène DsRed2. Dans la descendance de cette lignée, les graines jaunes seront de génotype  $ms45/ms45$  non transgéniques et mâles stériles.

Afin de générer des plantes mâles stériles en quantité suffisante pour la production d'hybrides, les lignées mâles stériles  $ms45/ms45$  sont semées à proximité de GM maintenir. Alors que le pollen transgénique des plantes GM maintenir ne pourra germer du fait de l'expression du transgène  $zm-aa1$ , seuls les grains de pollen non transgéniques polliniseront les plantes  $ms45/ms45$  et permettront d'amplifier la lignée. Ce croisement spécifique pourra être vérifié par l'absence de coloration des grains de maïs (Cigan et al., 2014)(Unger et al., 2002).

### Reverse breeding

Cette technique a pour objectif d'obtenir, à partir d'une plante hybride d'intérêt, deux plantes qui une fois croisées donneront la plante hybride souhaitée. Elle s'appuie sur une inhibition de la recombinaison méiotique par l'inactivation d'un gène (Par exemple : *DSMC1*, gène impliqué, chez les plantes, dans les *crossing-over* lors de la méiose). Cette inactivation peut être réalisée par une approche ARN interférent ou d'autres techniques. L'absence de recombinaison conduit à la génération de gamètes mâles et femelles dont les chromosomes parentaux restent « identiques ». A partir de chacun de ces gamètes, il est alors possible, *in vitro*, chez les plantes permissives, de générer des plantes haploïdes doubles homozygotes (DHs). Par sélection de ces plantes, il est par la suite possible d'identifier 2 parents potentiels qui permettront de produire des plantes hybrides identiques, non transgéniques (Wijnker et al., 2014)(Wijnker et al., 2012).



**Figure 1** : Stratégie du reverse breeding, génotypes du descendant sauvage (WT) et du descendant double haploïde. (Wijnker et al., 2012) (a) Le reverse breeding commence avec une plante hétérozygote dans laquelle la recombinaison méiotique peut être supprimée. (b) Génotype de 29 plantes sauvages doubles haploïdes sélectionnées au hasard. 3 individus sont représentés de manière verticale, les autres sont représentés par des lignes horizontales. Chaque ligne représente les chromosomes 1 à 5 pour une plante individuelle. Des chromosomes non recombinants sont présentés. (c) 21 génotypes sans crossing-over obtenus de 36 plantes double-haploïdes suite au reverse breeding. La première ligne présente un génotype identique à celui d'un des parents d'origine. Les autres lignes présentent des génotypes avec substitution d'un ou plusieurs chromosomes. Les quatre dernières lignes sont des descendants haploïdes qui ont tout de même réalisés des crossing-overs. (d) Trois paires de double-haploïdes obtenus par reverse breeding ont été croisées pour obtenir l'hybride original.

### Flowering time reduction

Cette technique a pour objectif de réduire le temps entre 2 générations de plantes afin de rendre la sélection classique par croisements plus courte.

## Modalités de mise en œuvre

Toutes les techniques de transfert génétique peuvent être utilisées pour obtenir des ségréants négatifs. Les virus non intégratifs et sans transmission verticale sont parfaitement adaptés.

## Avantages et contraintes par rapport aux techniques existantes

Cette approche met en œuvre des techniques existantes et permet d'obtenir des plantes non transgéniques ayant bénéficié de traits conférés par leurs parents génétiquement modifiés ou d'une sélection plus simple.

## Détection

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

La séquence modifiée dans le parent (par transgénèse classique ou SDN1/2/3, ODM, etc.) est éliminée par croisements lors de l'obtention de ségréants négatifs et ne peut donc servir à tracer ces derniers.

Cependant, la ségrégation négative vise à éliminer une modification génétique donnée mais conserve une partie du génome parental. Des mutations hors cibles ou des traces de vectorisation peuvent être préservées lors de ces croisements et pourraient éventuellement servir d'éléments de détection de la méthode utilisée, avec cependant les mêmes possibilités et limitations que celles citées dans les chapitres précédents.

### **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 ?**

En absence de modification traçable, il est pratiquement impossible de remonter à une technique, sauf s'il existe des traces génomiques dérivant de la méthode de transformation initiale, par exemple d'*Agrobacterium* ou de transgènes exogènes introduits dans *Agrobacterium*. Cependant même dans ce cas, la preuve qu'ils proviennent d'agrobactéries de laboratoire serait sans doute difficile à établir formellement.

**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 ?**

Pour les raisons déjà décrites, une présence de ce type de produit ne serait pas détectable dans une récolte et *a fortiori* dans les produits de transformation.

## **Bibliographie**

Cigan, A.M., Haug-Collet, K., and Clapp, J. (2014). Transcriptional silencing of heterologous anther promoters in maize: a genetic method to replace detasseling for seed production. *Plant Reprod.* 27, 109–120.

Unger, E., Cigan, A.M., Trimnell, M., Xu, R., Kendall, T., Roth, B., and Albertsen, M. (2002). A chimeric ecdysone receptor facilitates methoxyfenozone-dependent restoration of male fertility in ms45 maize. *Transgenic Res.* 11, 455–465.

Wijnker, E., van Dun, K., de Snoo, C.B., Lelivelt, C.L.C., Keurentjes, J.J.B., Naharudin, N.S., Ravi, M., Chan, S.W.L., de Jong, H., and Dirks, R. (2012). Reverse breeding in *Arabidopsis thaliana* generates homozygous parental lines from a heterozygous plant. *Nat. Genet.* 44, 467–470.

Wijnker, E., Deurhof, L., van de Belt, J., de Snoo, C.B., Blankestijn, H., Becker, F., Ravi, M., Chan, S.W.L., van Dun, K., Lelivelt, C.L.C., et al. (2014). Hybrid recreation by reverse breeding in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Protoc.* 9, 761–772.

Yamagishi, N., Kishigami, R., and Yoshikawa, N. (2014). Reduced generation time of apple seedlings to within a year by means of a plant virus vector: a new plant-breeding technique with no transmission of genetic modification to the next generation. *Plant Biotechnol. J.* 12, 60–68.