
Demande d'appui scientifique et technique des Laboratoires Nationaux de Référence OGM concernant les méthodes de détection des produits issus de NPBT

Demande « 2018-SA-0091 »

RAPPORT d'appui scientifique et technique

Juillet 2018

Mots clés

OGM, mutation, sélection, new breeding techniques, NBT, NGS,

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts, membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

██████████ – ██████████ – UBVO – LSV – Anses

Contribution scientifique

██████████ – ██████████ – UBVO – LSV – Anses

██████████ – ██████████ – UBVO – LSV – Anses

██████████ – ██████████ – UBVO – LSV – Anses

CONTRIBUTIONS EXTÉRIEURES À L'AGENCE

██████████ – ██████████ – BioGEVES – GEVES

██████████ – ████████ – Laboratoire de Strasbourg – SCL

██████████ – ██████████ – Laboratoire de Strasbourg – SCL

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| Présentation des intervenants | 3 |
| Sigles et abréviations | 5 |
| Définitions | 5 |
| 1 Contexte, objet et modalités de réalisation des travaux..... | 6 |
| 2 Situations examinées dans l'avis du Comité scientifique du HCB..... | 7 |
| 2.1 Modifications ciblées du génome | 7 |
| 2.2 Epigénétique..... | 7 |
| 2.3 Intégration des vecteurs et effecteurs | 7 |
| 3 Modalités actuelles de détection, identification et quantification des OGM de type SDN3 | 9 |
| 4 Capacité d'analyse actuelle des LNR sur la base de la PCR en temps réel..... | 11 |
| 5 Possibilités techniques d'analyse à moyen terme | 13 |
| 5.1 PCR en temps réel via plateforme micro-fluidique | 13 |
| 5.2 Génotypage SNP | 13 |
| 5.3 Séquençage de fragments d'intérêt..... | 15 |
| 5.4 Etude de la méthylation de l'ADN | 16 |
| 6 Possibilités techniques d'analyse à long terme..... | 18 |
| 6.1 Séquençage de génomes complets et recherche d'éléments génétiques exogènes... | 18 |
| 6.2 Séquençage de génomes complets et approches statistiques | 19 |
| 6.3 Conformation de la chromatine..... | 20 |
| 7 Bibliographie..... | 21 |
| ANNEXES | 23 |
| Annexe 1 : Lettre de la demande | 24 |
| Annexe 2 : Table récapitulative..... | 26 |

Sigles et abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

DGAI : Direction générale de l'alimentation

GEVES : Groupe d'étude et de contrôle des variétés et des semences

HCB : Haut comité des biotechnologies

LNR : Laboratoire national de référence

LRUE : Laboratoire de référence de l'union européenne

NBT : New breeding techniques

NGS : Next generation sequencing

NPBT : New plant breeding techniques

OGM : Organisme génétiquement modifié

PCR : Polymerase Chain Reaction

SCL : Service commun des laboratoires

SDN : Site directed nuclease

SNP : Single nucleotide polymorphism

Définitions

Conformément à la demande émise par la DGAI, ce document s'appuie directement sur l'avis du comité scientifique du Haut Conseil des Biotechnologies publié le 2 novembre 2017 et reprend les définitions des termes qui y sont employés.

Cependant, certains termes ont ici un usage propre :

- Détection : possibilité de détecter des traces d'un évènement de modification dans un produit simple ou complexe (ex : lot de semences, farine, denrée alimentaire...)
- Identification : possibilité d'identifier l'évènement de modification à partir d'un échantillon provenant d'un unique individu (fragments de feuille, graine individuelle...)

1 Contexte, objet et modalités de réalisation des travaux

Ce document a été rédigé conjointement par les trois laboratoires nationaux de référence (LNR) mandatés pour la réalisation des analyses officielles concernant la détection des OGM (ANSES : laboratoire de la santé des végétaux ; GEVES : Laboratoire de biologie moléculaire et de biochimie BioGEVES ; SCL : Laboratoire de Strasbourg). Il fait suite à une demande d'appui scientifique et technique adressée par la direction générale de l'alimentation (DGAI) du ministère en charge de l'agriculture et reçue par l'ANSES le 10 avril 2018.

A partir des différentes situations examinées par le Comité Scientifique du Haut Conseil des Biotechnologies (HCB) dans son avis publié le 2 novembre 2017 concernant les nouvelles techniques de sélection (NBT pour « New Breeding Techniques », ou NPBT pour « New Plant Breeding Techniques ») [1], la DGAI demande aux LNR :

- i) d'identifier les techniques actuellement disponibles qui leur permettraient de procéder à la détection, l'identification et la quantification des produits issus de NPBT,
- ii) de tenir compte des exigences en termes d'accréditation et de performance des méthodes d'analyse ainsi que des contraintes telles que le coût et la durée de l'analyse,
- iii) d'indiquer les possibilités et les perspectives de développement de méthodes adaptées et le cas échéant les besoins de mise au point ou de recherche.

2 Situations examinées dans l'avis du Comité scientifique du HCB

Ce document ne décrit pas les technologies qualifiées de NPBT et se focalise exclusivement sur les méthodes d'analyse utilisables afin de détecter, identifier et/ou quantifier les produits issus de ces technologies. Dans son avis, le comité scientifique du HCB examine différentes situations rappelées ci-après.

2.1 Modifications ciblées du génome

Diverses technologies permettent d'obtenir un organisme dont le génome a été modifié en un point préalablement établi par le biais de nucléases dirigées. L'avis du HCB différencie les produits issus de trois principaux types de modification.

La modification dite SDN1 (Site Directed Nuclease 1) est une insertion, une délétion ou une substitution d'un ou plusieurs nucléotides en un site particulier du génome

La modification dite SDN2 est une conversion allélique consistant à modifier un gène existant dans la plante sur tout ou partie de sa séquence. L'emplacement du gène et son nombre de copies ne sont pas modifiés.

La modification dite SDN3 est une intégration ciblée d'une séquence d'ADN quelle que soit l'origine et la longueur de celle-ci.

2.2 Epigénétique

Le terme d'épigénétique a été utilisé par Waddington en 1942 [2] pour décrire les modifications de phénotype transmissibles lors de la division cellulaire sans être associées à des changements de génotype. Les mutations épigénétiques peuvent être classées selon trois types en fonction de leur dépendance au génotype [3]. Les épiallèles « purs » sont totalement indépendants du génome, les épiallèles « facilités » sont liés à, voire causés par une variation du génome (mais peuvent persister après la disparition de celle-ci par excision ou ségrégation), enfin les épiallèles « obligatoires » sont directement liés à une variation génomique et co-ségrégés avec celle-ci.

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN situé dans le noyau est arrangé sous forme d'une structure compacte et organisée appelée chromatine. L'ADN y est enroulé autour de complexes protéiques appelés histones. Cette organisation est extrêmement dynamique, les complexes ADN/histone peuvent s'assembler, se stabiliser, se déstabiliser, se désassembler... Cette dynamique de la chromatine régule l'accessibilité de l'ADN et est à l'origine de la régulation de l'expression des gènes au cours de la vie d'une cellule ou de la vie d'un individu. Cette régulation peut également être transmise lors de la division cellulaire ou à la descendance et entre alors dans la définition de l'épigénétique. L'accessibilité de l'information génétique au sein de la chromatine fait appel à divers mécanismes, les deux principaux étant la méthylation de l'ADN et la modification covalente des histones [pour revues, voir : 4, 5].

2.3 Intégration des vecteurs et effecteurs

La vectorisation est le fait d'introduire et/ou faire exprimer une ou plusieurs macromolécules (ADN, ARN, protéines) dans une cellule. Le transfert de ces macromolécules peut se faire par des méthodes physiques (électroporation, biolistique, whiskers...) ou par le biais d'un vecteur d'origine

virale ou bactérienne (par exemple *Agrobacterium tumefaciens*). L'utilisation de vecteurs d'origine biologique peut entraîner l'intégration dans le génome de la cellule cible de petits fragments d'ADN allant de quelques paires de bases à une centaine de paires de bases [6].

Les effecteurs sont des protéines ou acides nucléiques (ADN ou ARN) dont l'action au sein d'une cellule conduit à l'obtention de la modification attendue. Les techniques de nucléases dirigées permettant la modification sur des sites spécifiques de génomes font appel à un nombre restreint d'effecteurs utilisés de manière récurrente. Cette utilisation fréquente peut permettre une détection à l'aide d'outils ciblant des zones conservées.

La présence de vecteurs et d'effecteurs dans l'organisme est supposée transitoire et en dehors d'une séquence volontairement intégrée, aucune séquence issue du vecteur ou de l'effecteur ne doit persister dans l'organisme transformé. Si une telle séquence est intégrée, sa détection peut constituer un élément de preuve de la technique utilisée bien que certaines de ces séquences puissent également être intégrées de manière naturelle dans des génomes de plante [7].

3 Modalités actuelles de détection, identification et quantification des OGM de type SDN3

La technique actuelle la plus répandue pour la recherche de végétaux génétiquement modifiés est la PCR en temps-réel. Une paire d'oligonucléotides (les amorces) est utilisée afin d'amplifier une région particulière du génome. La séquence des amorces est choisie pour être spécifique d'une région présente dans le génome de la plante génétiquement modifiée, et absente des variétés non modifiées. Au cours de la PCR, l'amplification de l'ADN cible est suivie à chaque cycle d'amplification via un signal de fluorescence. La comparaison de la cinétique d'amplification entre échantillons de concentration connue et inconnue permet d'établir à la fois le statut de l'échantillon inconnu (présence/absence de la cible) ainsi que sa concentration (quantité d'ADN cible introduite dans le milieu réactionnel). Selon les besoins, une sonde à hydrolyse (TaqMan) peut être utilisée afin d'améliorer la spécificité.

La stratégie préconisée par le laboratoire de référence de l'union européenne (LRUE) et couramment appliquée par les laboratoires consiste en premier lieu à réaliser une étape de détection en recherchant des éléments génétiques communs à plusieurs événements (promoteurs, terminateurs...). Cette étape permet d'établir le statut de l'échantillon (présence d'organisme génétiquement modifié (OGM) ou non) et d'orienter les analyses à mettre en œuvre afin d'identifier l'OGM présent. L'identification se fait via une batterie de tests, chaque test étant spécifique d'un ou plusieurs OGM. Enfin, les laboratoires réalisent en parallèle une quantification ciblant une région commune à l'ensemble des variétés de l'espèce cible, et une quantification spécifique de l'OGM identifié. Le rapport entre les deux résultats permet d'établir le taux représenté par l'OGM identifié au sein de l'espèce. Cette stratégie est appliquée pour tous types de matrices (semences, produits transformés...) et rend possible la détection, l'identification et la quantification dans les échantillons complexes (mélange d'espèces, faible teneur en OGM...).

Performance : La limite de détection de la PCR en temps réel telle qu'elle est actuellement utilisée est d'environ 3 à 5 copies d'ADN cible par puits. Il est communément admis que la limite de détection relative minimale atteinte est de 0,01% par espèce végétale. Toutefois, cette contrainte est principalement due à l'hétérogénéité de l'échantillon et à la capacité à prélever une prise d'essai représentative de la totalité de l'échantillon, et non aux performances de la PCR elle-même. La plage de quantification absolue est située entre 20 et plus de 100 000 copies, soit un ordre de grandeur de 10^5 . Afin de situer les échantillons par rapport aux seuils réglementaires (0,1% et 0,9%), les méthodes publiées ont pour la plupart été validées entre 0,1 et 5 à 10%, bien qu'il soit techniquement possible de dépasser ce seuil maximal.

Accréditation : La PCR en temps réel est une technique éprouvée depuis plus de 10 ans. Des normes ISO sont disponibles [8-11], ainsi qu'un guide d'application publié par l'AFNOR [12], et plusieurs documents de référence publiés par le LRUE. En routine Les trois LNR utilisent les méthodes validées et publiées par le LRUE et sont accrédités pour la mise en œuvre de celles-ci. Un guide de recommandation concernant la flexibilité de la portée d'accréditation publié par le LRUE est également disponible [13], ce qui permet de réduire les coûts d'accréditation au vu du rythme d'autorisation des plantes génétiquement modifiées dans l'Union Européenne et de la publication de méthodes de détection et de quantification.

Coût : Comme toute méthode de biologie moléculaire, la PCR en temps réel nécessite des locaux adaptés et permettant de limiter le risque de contamination. Cette technologie nécessite l'acquisition d'un thermocycleur compatible, dont le tarif varie entre 20 000 et 40 000€HT selon les modèles et les constructeurs. A titre indicatif, le coût en consommables pour l'analyse d'un échantillon négatif de maïs est d'environ 75€ (extraction et PCR de détection).

Durée : L'analyse d'un échantillon comprend différentes étapes. La préparation de l'échantillon peut prendre de 1 à 2h, en fonction de sa nature et de la quantité à analyser. La plupart des laboratoires de l'UE traitent en parallèle des séries d'environ 8 échantillons. L'extraction d'une série dure entre une demie et une journée complète. Afin de réduire les temps de manipulation, des automates d'extraction sont disponibles sur le marché (60 000 à 75 000€ selon le type d'automate), et certains laboratoires européens en sont équipés. Les PCR d'identification ou de quantification peuvent être mutualisées entre plusieurs échantillons. En respectant les contraintes définies dans les normes ISO, une PCR sur une plaque 96 puits peut permettre l'analyse simultanée de 23 échantillons pour une identification, et 8 échantillons pour une quantification. La durée de préparation peut varier entre 30 minutes et une heure, l'analyse dure entre 1h30 et 2h. Plusieurs semaines d'analyse peuvent ainsi être requises dans le cas d'échantillons complexes, contenant plusieurs espèces susceptibles d'être génétiquement modifiées. Par exemple, le SCL, dont le mandat regroupe l'ensemble des espèces végétales, est susceptible de rechercher jusqu'à 52 OGM différents dans le cas d'un échantillon contenant du soja, du maïs et du colza.

Limites : L'utilisation de la PCR en temps réel nécessite la connaissance préalable de la séquence ou du polymorphisme à rechercher. La validation d'une méthode de PCR en temps réel nécessite du matériel positif relativement pur. En l'absence de connaissance des séquences ou de matériel, il est impossible de développer et valider une méthode.

La quantification par PCR impose l'utilisation de témoins positifs, extraits à partir de matériels de référence certifiés, si possible à plusieurs concentrations, afin de réaliser une gamme étalon et de vérifier la justesse des mesures. Ceux-ci sont disponibles pour les plantes génétiquement modifiées ayant fait l'objet d'une demande d'autorisation de commercialisation dans l'UE. Dans le cas de plantes non autorisées, l'obtention de matériel de référence est plus complexe.

L'une des limites de la PCR en temps réel est l'utilisation d'une méthode spécifique pour chaque cible. En effet, la multiplication des OGM à rechercher implique une multiplication des méthodes à mettre en œuvre. Compte tenu du débit des plateformes employées, cette multiplication des méthodes est d'ores et déjà problématique.

Développement : Dans le cadre de la directive 2001/18/CE, un déposant fait la demande d'autorisation d'utilisation d'une plante génétiquement modifiée. Cette demande doit être accompagnée d'une méthode de détection, d'identification et de quantification développée par le déposant et dont les critères de performance minimaux ont été établis par LRUE et le réseau de LNR européens [14]. La méthode est fournie au LRUE qui la valide et la rend disponible aux LNR. À ce jour, les LNR n'ont donc pas la charge de développer les méthodes pour les OGM faisant l'objet d'une demande d'autorisation.

Dans le cas d'une suspicion de présence d'un OGM inconnu, une étape de séquençage est indispensable afin de développer une méthode spécifique. Des méthodologies de séquençage ont été publiées par des laboratoires travaillant sur cette thématique [15].

4 Capacité d'analyse actuelle des LNR sur la base de la PCR en temps réel

A ce jour, les LNR détectent, identifient et quantifient les événements de transformation à l'aide de méthodes de PCR en temps réel, ciblant des séquences connues, d'une longueur d'environ 70-80 paires de bases. Ces modalités d'analyse sont identiques à celles devant être mises en œuvre pour la détection, l'identification et la quantification de produits de SDN3 avec connaissance des cibles à détecter.

Les plateformes utilisées par les LNR permettent également de détecter, identifier et quantifier spécifiquement les ADN portant un polymorphisme connu sur un seul nucléotide (Single Nucleotide Polymorphism), ce qui correspond aux cas de figure des SDN1 et SDN2. En effet, la technologie de PCR en temps réel peut être employée avec des sondes à hydrolyse spécifiques au nucléotide près (par exemple les sondes Taqman-MGB). Cette approche est adaptée pour la détection d'un petit nombre de SNPs et pourra être utilisée pour la détection d'une présence fortuite de quelques dizaines de modifications de SNPs sur le même modèle que l'actuel contrôle de présence fortuite d'OGM et avec les mêmes appareils de PCR en temps réel. Dans le cas où un grand nombre de SNPs devraient être contrôlés (centaines ou milliers), l'utilisation d'appareils de PCR en temps réel ne serait plus concurrentielle face aux alternatives technologiques décrites dans le paragraphe 5.2 « génotypage SNP ».

La PCR en temps réel peut également être utilisée pour rechercher des séquences résiduelles issues de vecteurs ou d'effecteur

Performance : La PCR en temps réel permet la détection, l'identification et la quantification de produits obtenus par SDN1, SDN2 ou SDN3 ainsi que de séquences issues de vecteurs ou d'effecteurs. Dans le cas des SDN3, et des séquences de vecteurs et d'effecteur, le niveau de performance attendu est celui obtenu aujourd'hui en analyse d'événements de transformation. La limite de détection attendue en détection de SNP pour l'analyse de produits de SDN1 ou 2 reste extrêmement basse (de l'ordre de 20 copies d'ADN cible par réaction [16]). Cependant, la spécificité de la réaction résidant uniquement sur une base, le bruit de fond obtenu en présence d'ADN non muté empêchera la détection d'une proportion inférieure à 1/100^{ème} d'ADN muté dans de l'ADN non muté [17].

Accréditation : Ces méthodes ne sont pas différentes de celles couramment employées par les LNR et peuvent être accréditées sur la base des systèmes qualité existants.

Coût : L'équipement nécessaire (thermocycleur en temps réel) coûte entre 20 000 et 40 000€. Celui-ci est d'ores et déjà présent au sein des laboratoires. L'augmentation du nombre de cibles analysables via ce type de technologie est limitée mais peut être sensiblement augmentée par rapport à l'existant via des plateformes de préparation automatisée (60 000 à 75 000€).

Le coût unitaire de détection de SDN1, 2, 3, d'effecteurs ou de vecteur par PCR en temps réel correspond au coût actuel de détection d'un événement de transformation. Dans le cas de la détection de multiples SNPs sur un même échantillon, une réaction est nécessaire pour chaque SNP testé.

Durée : Ces méthodes ne sont pas différentes de celles couramment employées par les LNR, les délais d'analyse sont équivalents (sauf multiplication importante du nombre de SNPs à tester).

Limites : Ces techniques ne sont pas applicables en l'absence d'information préalable sur la séquence ou le polymorphisme à rechercher. Par ailleurs, pour des modifications susceptibles d'apparaître naturellement, la technologie ne fournira pas d'information concernant les modalités

d'obtention ou d'apparition de ce polymorphisme. L'analyse d'échantillons comportant des versions non mutées en mélange avec la cible rehausse la limite de détection relative de la cible. Enfin, les plateformes d'analyse de PCR en temps réel nécessitent une préparation de mélange réactionnel pour chaque cible et ne sont pas adaptées à la multiplication des cibles à tester par échantillon.

Recherche et développement : Bien que des données de performance concernant des outils de PCR en temps réel ciblant des SNP, soient disponibles dans la bibliographie, les LNR OGM ne disposent pas de telles données dans leur environnement de travail. La mise en œuvre de validations spécifiques sur du matériel adapté permettrait aux laboratoires de se préparer à l'éventualité de telles analyses.

L'analyse des séquences de vecteurs et d'effecteurs couramment employés devrait permettre de définir une ou des méthodes de PCR en temps réel permettant de s'assurer que ces éléments génétiques ne sont pas présents dans le produit analysé. Une telle méthode ne pourra déterminer si des portions de ces éléments génétiques se sont introduites dans le génome.

5 Possibilités techniques d'analyse à moyen terme

Diverses technologies sont dès à présent employées en routine et pourraient si nécessaire être implémentées par les LNR afin d'assurer les analyses :

5.1 PCR en temps réel via plateforme micro-fluidique

Comme évoqué précédemment, la détection de SDN1 et 2 correspond à la recherche de mutations ponctuelles (SNP), la PCR en temps réelle est tout à fait adaptée à la détection, l'identification et la quantification de telles modifications du génome, à condition que le nombre de cibles ne soit pas trop important. Il existe des plateformes, telles que les puces micro-fluidiques, plus adaptées que des appareils de PCR en temps réel classiques pour le passage de plusieurs centaines de tests de génotypage Taqman-MGB. Les puces micro-fluidiques Fluidigm® par exemple permettent jusqu'à 4 608 réactions en parallèle pour le génotypage de 192 SNPs sur 24 échantillons.

Accréditation : La réaction reste de la PCR en temps réel et peut donc être accréditée sans évolution majeure du système qualité en place dans les laboratoires.

Coût : Les plateformes micro-fluidiques représentent des investissements lourds. A titre d'exemple la plateforme Fluidigm® Biomark coûte environ 200 000€. Chaque réaction se fait au sein d'une puce permettant d'analyser en simultané 48 cibles sur 48 échantillons, 96 cibles sur 96 échantillons ou 192 cibles sur 24 échantillons. Le coût de cette puce varie entre 500 et 1 000€. Les réactifs quant à eux sont identiques à ceux utilisés à ce jour, en revanche les réactions se faisant dans des volumes infimes, les coûts de réactifs sont très inférieurs aux coûts actuels.

Durée : La durée de la réaction est identique à celle d'une PCR en temps réel traditionnelle. Le temps de préparation d'une puce est bien plus important que celui d'une plaque traditionnelle. Cependant une plaque micro-fluidique permet de traiter l'équivalent de 96 plaques traditionnelles en une réaction.

Limites : Mise à part la possibilité de réduire le nombre de réactions à réaliser et donc de réduire les durées d'analyses, les limites sont identiques à celles de la PCR en temps réel traditionnelle. En effet, cette technique nécessite la connaissance préalable de la séquence ou du polymorphisme à rechercher. Lors de la recherche de SNP, elle ne fournit pas d'information concernant les modalités d'obtention ou d'apparition de ce polymorphisme.

Recherche et développement : Le transfert de méthode de PCR en temps réel depuis une plateforme traditionnelle à une plateforme micro-fluidique n'est pas supposée poser de problème technique. Une telle plateforme est disponible au sein d'un laboratoire de l'ANSES et pourrait si nécessaire permettre la réalisation d'essais préliminaires sans investissement important.

5.2 Génotypage SNP

D'autres technologies sont déjà utilisées pour le génotypage d'individus via la lecture de nombreux SNPs préalablement identifiés. Les technologies de génotypage par amorces fluorescentes (KASP™), par exemple, permettent l'analyse de plusieurs centaines de SNPs sur un même échantillon. Il existe également des puces à hybridation de type Affymetrix®, lesquelles permettent le génotypage de dizaines de milliers de SNPs.

Performance : Ces technologies sont adaptées au génotypage et permettent l'identification d'un échantillon ou d'un individu sur la base d'un très grand nombre de SNPs lus en simultané.

Cependant, l'échantillon doit contenir au moins 50% de cible modifiée, ces technologies ne sont donc pas adaptées à la détection d'une présence fortuite d'un SNP à faible taux. Ces techniques peuvent éventuellement être utilisées pour déterminer la présence ou l'absence d'une séquence cible (SDN3, vecteurs, effecteurs). En revanche, elles ne permettent pas la quantification d'une cible.

Accréditation : La réalisation de génotypage par amorces fluorescentes de type KASP™ n'est pas sensiblement différente de la PCR en temps réel. La réalisation de telles analyses sous accréditation est envisageable sous réserve d'une adaptation du système qualité et d'une validation de l'ensemble des amplifications nécessaires à la lecture des SNPs. Le génotypage via des puces est utilisé en diagnostic médical par des laboratoires respectant des engagements qualité. Cependant le management de la qualité associé à ce type de plateforme est très différent de celui actuellement en place dans les laboratoires.

Coût : Le génotypage KASP™ peut être réalisé à l'aide d'équipements dédiés à la PCR en temps réel. Cependant, afin de tirer pleinement bénéfice de la technologie et de multiplier les cibles, il est nécessaire d'investir dans des équipements permettant un plus haut débit tels qu'un automate de préparation de plaques (75 000€), un hydrocycleur (50 000€) et un lecteur de fluorescence associé à un logiciel de génotypage dédié (100 000€). Les consommables associés au génotypage KASP™ sont des consommables de PCR. Par ailleurs, il n'est pas nécessaire de faire produire une sonde fluorescente pour chaque cible ce qui permet de limiter les coûts. Le génotypage d'un échantillon sur 380 SNPs coûte environ 50€ (extraction, dosage, normalisation, PCR et lecture).

La lecture des puces nécessite l'investissement dans des appareils d'hybridation et de lecture dédiés. Le coût de ces plateformes varie grandement en fonction de l'automatisation, du débit et des applications associées (GeneAtlas™ environ 350 000€ ; GeneChip® environ 1 800 000€ ; GeneTitan® environ 3 000 000€). Le coût associé à l'utilisation de puces est principalement lié au développement de celles-ci, en effet pour chaque nouveau SNP à tester, une sonde doit être créée à façon et testée afin de passer des contrôles qualités réalisés par le fournisseur. En dehors des coûts d'équipement et de développement et à titre indicatif, un programme de génotypage de 200 échantillons sur 70 000 SNPs à l'aide de puces disponibles au catalogue du fournisseur coûte 20 000 euros (réactifs et lecture).

Durée : En testant l'ensemble des SNPs en simultanément, une analyse à l'aide d'amorces fluorescentes peut être réalisée au cours d'une simple PCR. Dans le cadre d'une analyse à l'aide de puces à hybridation, l'ensemble du protocole (préparation des acides nucléiques, hybridation et lecture) se déroule sur environ trois jours.

Limites : Bien que pouvant être utilisées pour l'identification de produits de SDN3, de séquences de vecteurs ou d'effecteurs, ces technologies sont particulièrement indiquées pour l'identification de produits issus de SDN1 et SDN2. Dans tous les cas, les polymorphismes doivent être préalablement identifiés, les échantillons fournis doivent être purs. Dans le cadre de génotypage KASP™ il est nécessaire d'analyser simultanément un minimum de 24 échantillons ou témoins pour permettre une prédiction fiable de l'identité des SNPs.

L'utilisation de puces nécessite une expertise qui n'est pas disponible à ce jour au sein des laboratoires. Par ailleurs, en dehors du coût de développement, l'optimisation des coûts de production de puces nécessite leur fabrication en lots ce qui réduit la flexibilité des cibles pouvant être analysées. La lecture des puces nécessite également l'investissement dans des appareils d'hybridation et de lecture dédiés.

Recherche et développement : Le passage à des technologies de génotypage est envisageable mais nécessite un important travail méthodologique avant mise en routine. Dans un premier temps une plateforme dédiée doit être mise en place. Ensuite, pour chaque SNP, une PCR ou une sonde d'hybridation doit être développée et validée. Enfin, l'analyse des résultats nécessite des outils bio-informatiques et statistiques adaptés. Le GEVES emploie déjà le génotypage par amorces

fluorescentes dans le cadre de ses missions de caractérisation et de contrôle des variétés végétales.

5.3 Séquençage de fragments d'intérêt

A partir d'un extrait d'acides nucléiques, il est possible d'isoler un fragment d'intérêt par amplification ou par capture et de séquencer celui-ci. En cas de modifications génétiques, des différences pourront être identifiées entre la séquence du fragment d'intérêt de la plante modifiée et la séquence attendue.

En fonction du nombre de séquences d'intérêt, de la longueur de séquence nécessaire ou du nombre d'échantillons à analyser, le séquençage peut être réalisé par séquençage Sanger ou par une technique de séquençage dite à haut débit (NGS « Next Generation Sequencing »). Pour chaque séquence cible, le séquençage Sanger donnera une séquence consensus par échantillon alors que la technique NGS permettra d'obtenir de très nombreuses séquences par échantillon. De plus, le séquençage haut débit permet le multiplexage (analyse en simultané) de nombreux échantillons grâce à une identification de chaque échantillon à l'aide d'une séquence spécifique (tag).

Performance : Le séquençage constitue une technique performante permettant de connaître la séquence exacte d'un fragment d'intérêt. Cette technique permet de mettre en évidence des mutations ponctuelles (SNPs) (SDN1 ou 2) ou des modifications plus importantes de plusieurs bases (SDN2 ou 3). L'édition du chromatogramme en séquençage Sanger et le contrôle des données NGS avec le logiciel FastQC permettent de s'assurer de la qualité des données obtenues. Le séquençage Sanger permet exclusivement l'identification tandis que le séquençage NGS peut permettre une détection. Le niveau de performance de cette détection dépend de la profondeur de séquençage, laquelle est liée à la technologie employée, au nombre d'échantillons multiplexés et donc au coût du séquençage. A titre informatif des analyses ont été réalisées avec une limite de détection relative de 1%.

La taille des fragments d'intérêt à séquencer varie également en fonction du séquenceur employé, celle-ci pouvant aller de quelques dizaines de bases (Sanger, Illumina) à 100 000 bases (Minlon™).

Accréditation : L'accréditation de ces approches est envisageable sous réserve de maîtriser la qualité des étapes de séquençage (par un prestataire ou par le laboratoire). Le développement et déploiement des petits séquenceurs de laboratoire de type Minlon™ permet d'envisager à moyen terme la réalisation et la maîtrise de l'ensemble de l'analyse par le laboratoire.

Coût : Pour un séquençage externalisé, le coût dépend de la technologie employée, il est d'environ 5€ par séquence ciblée et par échantillon pour un séquençage Sanger. Dans le cas des NGS le coût élevé d'une réaction de séquençage est compensé par la possibilité de multiplexer un grand nombre d'échantillons et de cibles. Ce multiplexage permet d'abaisser le coût à environ 20€ par cible et par échantillon. La recherche simultanée de polymorphismes sur plusieurs zones du génome implique de multiplier les séquençages ou d'augmenter le multiplexage.

La réalisation du séquençage par le laboratoire nécessite l'acquisition d'un séquenceur adapté (par exemple Illumina MiniSeq™ coûtant environ 50 000€). Le coût par échantillon sera également plus élevé en raison du moindre débit d'analyse.

Durée : Le séquençage étant réalisé par des prestataires privés ou sur des plateformes, le temps d'analyse minimal est d'environ une semaine pour un séquençage Sanger. Il peut atteindre plusieurs mois pour certaines plateformes. Ces temps d'analyse seront fortement réduits par la possibilité de maîtriser l'ensemble de l'analyse au sein du laboratoire.

Limites : Cette approche nécessite la connaissance préalable de la zone à séquencer afin de pouvoir amplifier le fragment d'intérêt par PCR ou de pouvoir capturer celui-ci. L'amplification de

chaque fragment est relativement aisée à mettre au point, en revanche, en termes de manipulation, elle implique la réalisation d'une réaction pour chaque fragment. Inversement la capture n'est pas encore au point techniquement (manque de spécificité), mais celle-ci devrait à terme permettre la sélection simultanée d'un grand nombre de séquences d'intérêt. Une autre limite de cette approche est le taux d'erreurs introduites lors de l'étape de PCR et lors du séquençage. Cependant, des techniques utilisant des séquences spécifiques (tag) permettent de différencier les mutations vraies des mutations liées aux erreurs de PCR et de séquençage [18]. En fonction du type de technologie employée, l'analyse des résultats nécessite des outils bio-informatiques et statistiques adaptés.

Recherche et développement : Le passage à des technologies de séquençage de fragments d'intérêt en routine nécessite un travail méthodologique plus ou moins important en fonction de l'approche envisagée aussi bien à l'étape de sélection des séquences d'intérêt qu'à l'étape de séquençage.

Comme cela a été évoqué, l'utilisation de la PCR ne nécessite pas spécialement de mise au point mais sera rapidement limitante. Le système de capture de séquences d'intérêt permettrait quant à lui la sélection puis le séquençage d'un grand nombre de cibles. Cependant les essais réalisés par l'ANSES manquent de spécificité et ne permettent pas un enrichissement suffisant de l'extrait en ADN cibles. L'ANSES souhaite maintenir un effort de recherche concernant ce mode de préparation d'échantillon.

Concernant l'étape de séquençage, la technologie Sanger n'est utilisable qu'après une PCR, développée et validée pour chaque portion de génome à contrôler. Dans ce cas l'analyse des résultats nécessite des outils bio-informatiques relativement accessibles. Le recours à un séquençage NGS externalisé nécessite une expertise en termes de préparation d'échantillon, les outils bio-informatiques à mettre en œuvre sont également plus complexes. Enfin, la gestion de l'ensemble de l'analyse nécessite l'acquisition et la maîtrise d'une plateforme de séquençage ainsi que la maîtrise des outils bio-informatiques et statistiques adaptés. L'ANSES dispose à ce jour de plateformes de séquençage NGS de type IonProton™ et Minlon™ ainsi que d'un service bio-informatique dédié. Le LNR OGM de l'ANSES dispose d'une plateforme Minlon™, expérimente son utilisation dans le cadre de l'identification d'évènements de transformation et souhaite maintenir un effort de recherche concernant ce mode d'analyse d'échantillons.

5.4 Etude de la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN correspond à la fixation covalente d'un groupement méthyle à certains nucléotides de l'ADN (principalement les cytosines). La modification de la méthylation de l'ADN est associée à la régulation des gènes chez les eucaryotes [pour revue, voir: 19].

La principale technologie employée afin d'étudier la méthylation de l'ADN est la conversion au bisulfite associée au séquençage. Au cours de ce traitement, les cytosines non méthylées sont transformées en uraciles. Par la suite l'ADN converti peut être amplifié et séquencé. La présence de cytosines dans la séquence obtenue traduit la présence de groupements méthyles sur ceux-ci. L'analyse des données permet de déterminer la méthylation d'un site mais également le niveau de méthylation d'une région du génome analysée.

Le traitement au bisulfite ne représente pas de difficulté technique majeure et peut être intégré dans un schéma d'analyse traditionnel avec amplification et/ou séquençage.

Performance : La conversion au bisulfite est un mode de préparation de l'ADN, le niveau de performance dépend de la technologie subséquente. Dans le cadre de la détection d'un mutant épigénétique identifié à une position définie, une PCR temps réelle peut être employée afin de détecter ce mutant avec une limite de détection de 0,01%. A l'inverse, à moins d'avoir recours à une stratégie complexe et coûteuse, le séquençage des ADN convertis ne permettra pas la détection d'individus en mélange mais simplement l'identification d'individus séparés.

Accréditation : L'accréditation d'un tel protocole semble envisageable dans les mêmes conditions que pour les technologies subséquentes (PCR, séquençage...).

Coût : Le coût de la conversion de l'ADN est très limité (environ 2€ par extrait), le coût de l'analyse dépend de la technologie appliquée à l'ADN converti.

Durée : La durée du traitement au bisulfite n'est pas limitante dans le cadre d'activité des LNR.

Limites : Comme évoqué précédemment, le traitement au bisulfite n'est qu'un mode de préparation de l'ADN. Associé à la PCR en temps réel il permet aisément de détecter spécifiquement une séquence donnée à un niveau de méthylation donné. Associé au séquençage, il permet aisément de comparer le niveau de méthylation de séquences ciblées. Les limites sont les mêmes que pour les analyses traditionnelles : la connaissance du site potentiellement modifié ainsi que son état attendu sont des prérequis à toute analyse. En l'absence de connaissance préalable, seul un séquençage de génome complet peut être mis en œuvre. L'analyse des données pourrait mettre en évidence des anomalies majeures dans le profil de méthylation d'un génome. Une analyse plus fine nécessiterait un épigénome de référence qui n'est pas disponible à ce jour.

Recherche et développement : Cette approche est aujourd'hui couramment employée en recherche. L'établissement de collaborations entre les laboratoires d'analyse et de recherche devrait permettre un transfert de compétence. L'acquisition de données concernant le niveau de méthylation des génomes des espèces d'intérêt est un prérequis à toute analyse de génome complet.

6 Possibilités techniques d'analyse à long terme

6.1 Séquençage de génomes complets et recherche d'éléments génétiques exogènes

L'insertion d'une séquence dont la nature et la position ne sont pas préalablement identifiées ne peut être détectée via les approches ciblées mises en œuvre à ce jour. Afin d'identifier ce type de modification, il est nécessaire d'analyser l'ensemble de l'information génétique de l'individu ou de l'échantillon à tester. Les nouvelles technologies de séquençage à haut débit (NGS) permettent d'acquérir la séquence complète d'un individu ou une portion importante de l'information génétique présente dans un échantillon. A l'aide d'outils bio-informatiques, ces séquences peuvent ensuite être comparées à des bases de données regroupant des données de séquence disponibles pour divers organismes.

Performance : Via l'analyse d'un génome complet, il est possible de vérifier la présence de modifications de type SDN 1, 2 ou 3 à des sites préalablement établis. Cependant, cette approche est surdimensionnée pour ce type d'application. Cette approche peut également permettre d'identifier des séquences exogènes sans information préalable, elle est donc applicable aux produits de SDN3 ainsi qu'à la recherche de séquences issues de vecteurs et d'effecteurs. Son niveau de performance est directement dépendant de la profondeur de séquençage et des modalités d'analyse. Dans le cadre d'une identification, la couverture intégrale d'un grand génome de plante tel que celui du maïs, nécessite un séquençage important et coûteux. Dans le cadre d'une détection dans un échantillon complexe, la profondeur de séquençage requise devient trop importante pour être envisageable à ce jour.

L'analyse des résultats influe également sur le niveau de performance de cette approche. La stratégie la plus simple et efficace est d'établir une base de donnée des séquences potentiellement employées dans le cadre de la transformation et de comparer chaque séquence brute issue du séquençage (« read ») à celles listées dans cette base de donnée. Cependant, cette approche permet uniquement d'identifier un échantillon contenant l'une des séquences préalablement identifiées et introduites dans la base. Une autre approche serait de comparer chaque « read » à l'ensemble des données connues, cependant, cette dernière nécessite une puissance de calcul difficilement accessible.

Accréditation : Comme cela a été évoqué, l'accréditation de cette approche nécessite la maîtrise qualité des étapes de séquençages. Le développement et déploiement des petits séquenceurs de laboratoire permet d'envisager à moyen terme la maîtrise de l'ensemble de l'analyse par le laboratoire.

Coût : Les appareils susceptibles d'offrir une profondeur de séquençage adaptée à ce type d'approche (par exemple Illumina NextSeq™ ou HiSeq™) sont accessibles sur certaines plateformes de séquençage. De nombreuses sociétés offrent également des prestations de séquençage utilisant ce type d'équipement. A titre indicatif, le coût à l'achat d'un Illumina NextSeq™ est d'environ 250 000€, celui d'un Illumina HiSeq™ est d'environ 650 000€.

A ce jour, une prestation de séquençage Illumina HiSeq™ offrant une couverture suffisante pour un génome complet de maïs coûte environ 4 000€.

Durée : En fonction de l'appareil employé et de la profondeur de séquençage souhaitée, le séquençage dure entre 10 heures et 6 jours.

Limites : La disponibilité des équipements, le coût des analyses et la maîtrise des techniques sont autant de freins pour la mise en œuvre de ce type d'approche. Par ailleurs, cette stratégie repose sur l'identification d'une séquence issue du génome d'un autre organisme via la création d'une base de données adaptée. Elle ne permet pas de détecter sans a priori que la séquence a été modifiée. Enfin, cette approche nécessite une technicité et des compétences en bio-informatique qui ne sont pas nécessairement présentes dans les laboratoires. Avec la baisse des coûts de séquençage et la possibilité d'acquisition de séquenceurs par les laboratoires, ce type d'approche devrait devenir envisageable.

Recherche et développement : Comme évoqué précédemment, le recours à un séquençage NGS nécessite une expertise en termes de préparation d'échantillon, de réalisation du séquençage et de traitement des données. Ces approches sont largement déployées dans différents domaines de la recherche et commencent à être employées en analyse. Cependant leur transfert nécessite l'acquisition de compétences nouvelles par les laboratoires.

Le recours à une base de données spécifique regroupant les données de séquences potentiellement employées dans le cadre de modifications de type SDN1, 2 ou 3 (vecteurs, effecteurs, promoteurs, gènes d'intérêt, terminateurs...) nécessite un travail préalable de compilation et de validation. Par la suite, une telle base nécessite une mise à jour régulière à partir de données issues de la littérature scientifique, de brevets... Une telle base de données est entretenue par le LRUE à partir des données de séquences fournies par les déposants lors des demandes d'autorisation. Cependant, cette base ne peut être rendue accessible aux LNR pour des raisons de propriété des données.

6.2 Séquençage de génomes complets et approches statistiques

Sur la base de résultats de séquençage de génome complet, il est possible d'envisager une approche ne cherchant pas à établir une comparaison des séquences issues de l'échantillon avec des séquences issues du génome d'autres organismes, mais cherchant plutôt à identifier via des approches statistiques des anomalies dans la séquence. Ces anomalies pouvant être attribuées à l'insertion d'une séquence exogène.

Performance : Cette approche serait la seule à permettre l'identification de certaines modifications de type SDN3 sans information préalable et sans que la séquence introduite ne soit issue d'un organisme connu. Le niveau de performance de ce type d'approche dans le cadre de l'identification de modification de type SDN3 n'a pas encore été évalué. Cependant, un tel outil étant basé sur une différence statistique entre le fond génétique et la séquence introduite, il est acquis qu'il ne serait pas en mesure de détecter toutes les SDN3.

Accréditation : Cette approche est prospective et n'est pas destinée à une utilisation en routine à court terme. Par ailleurs, compte tenu du type de résultat obtenu (probabilité d'être en présence d'un échantillon positif), l'accréditation d'une telle approche n'est pas envisageable à ce jour.

Coût : Les coûts de séquençage sont ceux indiqués au paragraphe 6.1 « Séquençage de génomes complets et recherche d'éléments génétiques exogènes ».

Durée : La durée de séquençage est celle indiquée au paragraphe 6.1 « Séquençage de génomes complets et recherche d'éléments génétiques exogènes ».

Limites : Un tel outil devrait permettre d'identifier certaines portions du génome comme étant susceptibles d'avoir été introduites. Ce résultat ne saurait constituer une preuve de l'origine de cette séquence ou de la méthode employée pour l'introduire dans l'organisme séquençé.

Recherche et développement : Cette approche est aujourd'hui développée au sein de l'ANSES dans le cadre d'un projet de thèse en bio-informatique en collaboration entre le LNR OGM et la plateforme de bio-informatique. Un premier outil sera rendu disponible fin 2019, en fonction des résultats obtenus, cette approche pourra être développée beaucoup plus largement.

6.3 Conformation de la chromatine

Les protéines histones associées à l'ADN au sein de la chromatine peuvent faire l'objet de diverses modifications par adjonction de groupements acétyle, méthyle ou de petits peptides à leur extrémité N-terminale. Toutes ces modifications impactent la conformation tridimensionnelle de la chromatine.

Des anticorps spécifiques de certains épitopes protéiques peuvent être employés afin d'immuno-précipiter l'ADN lié à des protéines dans la conformation souhaitée. Cependant, plutôt que d'étudier directement les modifications des histones, certaines technologies telles que l'ATAC-seq [20] ou l'Hi-C [21] sont basées sur le séquençage et proposent d'étudier directement la structure 3D de la chromatine. Parmi celles-ci, la plus accessible semble être l'ATAC-seq basée sur l'accessibilité de certains sites de la chromatine par des transposases lesquelles vont intégrer des adaptateurs dans les sites accessibles et permettre le séquençage depuis ces points du génome.

Performance : Cette technologie permet de dresser une cartographie de l'ouverture de la chromatine d'un individu à un temps donné.

Accréditation : A ce jour l'ATAC-Seq comme les autres technologies de ce type sont des outils de recherche fondamentale et sont difficilement compatibles avec les contraintes liées à l'accréditation. Le principal obstacle sera la disponibilité de matériel de référence connu ayant un ADN de conformation connue et maîtrisée.

Coût : Le principal coût de la technique repose sur l'utilisation de plateformes de séquençage haut débit. En fonction de la résolution souhaitée, il est possible de multiplexer les échantillons et de descendre à un coût de l'ordre de la centaine d'euros par échantillon.

Durée : De grosses structures de recherche en épigénétique sont capables de traiter jusqu'à 60 échantillons par jour en ATAC-Seq. En revanche les moyens bio-informatiques nécessaires au traitement des données ne doivent pas être négligés.

Limites : L'étude de la conformation tridimensionnelle de la chromatine nécessite des cellules intègres. Elle n'est donc applicable que sur des tissus frais et en aucun cas sur du matériel transformé. Par ailleurs l'état physiologique de la plante et son stade de développement influent fortement sur la structure tridimensionnelle de la chromatine. Enfin, compte tenu de la plasticité des zones non codantes qui constituent la grande majorité des génomes, la structure change de manière importante d'une variété à une autre. La mise en œuvre de ce type de technologie dans le cadre d'analyses nécessiterait donc de cultiver la variété suspectée d'avoir été modifiée en parallèle de cette même variété connue pour ne pas avoir été modifiée. La mise en œuvre de telles analyses reste difficilement envisageable à ce jour.

Recherche et développement : Les approches permettant de décrire l'ouverture de la chromatine sont à ce jour principalement employées en recherche médicale. Les moyens nécessaires à leur mise en œuvre ne sont pas encore compatibles avec l'analyse dans le cadre de la détection et de l'identification des plantes issues de SDN.

Date de validation du rapport : 31 juillet 2018


7 Bibliographie

1. *Avis sur les nouvelles techniques d'obtention de plantes (New Plant Breeding Techniques - NPBT)*. 2017, Conseil scientifique du Haut Comité des Biotechnologies.
2. Waddington, C.H., *The epigenotype*. Endeavour, 1942. **1**: p. 18-20.
3. Richards, E.J., *Inherited epigenetic variation—revisiting soft inheritance*. Nature Reviews Genetics, 2006. **7**(5): p. 395.
4. Allis, C.D. and T. Jenuwein, *The molecular hallmarks of epigenetic control*. Nature Reviews Genetics, 2016. **17**(8): p. 487.
5. Shafiq, S. and A.R. Khan, *Plant epigenetics and crop improvement*, in *PlantOmics: the omics of plant science*. 2015, Springer. p. 157-179.
6. Brunaud, V., et al., *T-DNA integration into the Arabidopsis genome depends on sequences of pre-insertion sites*. EMBO reports, 2002. **3**(12): p. 1152-1157.
7. Kyndt, T., et al., *The genome of cultivated sweet potato contains Agrobacterium T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. **112**(18): p. 5844-5849.
8. *NF EN ISO 24276 - Produits alimentaires - Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés - Exigences générales et définitions*.
9. *NF EN ISO 21569 - Produits alimentaires - Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés - Méthodes qualitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques*
10. *NF EN ISO 21570 - Produits alimentaires - Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés - Méthodes quantitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques*
11. *NF EN ISO 21571 - Produits alimentaires - Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés - Extraction des acides nucléiques*
12. *GA V03-042 - Produits alimentaires - Manuel d'application aux normes NF EN ISO 24276 , NF EN ISO 21569 , NF EN ISO 21570, NF EN ISO 21571 et leurs amendements 1 - Méthodes d'analyses pour la détection des organismes génétiquement modifiés et produits dérivés*
13. Trapmann, S., et al., *European technical guidance document for the flexible scope accreditation of laboratories quantifying GMOs*. Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2013.
14. Mazzara, M., et al., *Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing*. European Network of GMO Laboratories. JRC, European Commission, European Network of GMO Laboratories, Brussels, 2008.
15. Fraiture, M.-A., et al., *An innovative and integrated approach based on DNA walking to identify unauthorised GMOs*. Food Chemistry, 2014. **147**: p. 60-69.
16. Van Ert, M.N., et al., *Strain-specific single-nucleotide polymorphism assays for the Bacillus anthracis Ames strain*. Journal of clinical microbiology, 2007. **45**(1): p. 47-53.
17. Clément, J., et al., *Specific detection and quantification of virulent/avirulent P hytophthora infestans isolates using a real-time PCR assay that targets polymorphisms of the Avr3a gene*. Letters in applied microbiology, 2013. **56**(5): p. 322-332.
18. Ståhlberg, A., et al., *Simple, multiplexed, PCR-based barcoding of DNA enables sensitive mutation detection in liquid biopsies using sequencing*. Nucleic acids research, 2016. **44**(11): p. e105-e105.
19. Law, J.A. and S.E. Jacobsen, *Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals*. Nature Reviews Genetics, 2010. **11**(3): p. 204.

20. Buenrostro, J.D., et al., *Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position*. Nature methods, 2013. **10**(12): p. 1213.
21. Lieberman-Aiden, E., et al., *Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome*. science, 2009. **326**(5950): p. 289-293.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de la demande

| | | |
|--|--|--|
| <p>2018 -SA- 0 0 9 1</p> |  <small>Liberté • Égalité • Fraternité</small> REPUBLIQUE FRANÇAISE | <p>COURRIER ARRIVE</p> <p>10 AVR. 2018</p> <p>DIRECTION GENERALE</p> |
| MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION | | |
| <p>Direction générale de l'alimentation</p> <p>Service des actions sanitaires en production primaire</p> <p>Sous-direction de la qualité, de la santé et de la protection des végétaux</p> <p>Bureau des semences et de la protection intégrée des cultures</p> <p>251, rue de Vaugirard 75732 PARIS CEDEX 15</p> <p>Dossier suivi par : [REDACTED]</p> <p>Tel. : 01 49 [REDACTED] Fax : 01 49 [REDACTED]</p> <p>Réf. : [REDACTED]</p> | <p>Le Directeur général de l'alimentation</p> <p>à</p> <p>Monsieur le Directeur général de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail</p> <p>14 rue Pierre et Marie Curie 94701 MAISONS-ALFORT CEDEX</p> | <p>Paris, le</p> <p>- 6 AVR. 2018</p> |
| <p>Objet: Demande d'appui scientifique et technique du Laboratoire National de Référence OGM de l'ANSES concernant les méthodes de détection des produits issus de NPBT.</p> | | |
| <p>Les nouvelles techniques de sélection (NBT pour New Breeding Techniques, ou NPBT pour New Plant Breeding Techniques) comprennent un ensemble de techniques récentes visant à modifier le génome de manière ciblée, à moduler l'expression des gènes ou à appliquer la transgénèse dans des situations particulières. Les techniques de modifications ciblées du génome (mutation ou insertion de gène en un site précis du génome) sont les plus innovantes et sont en évolution rapide.</p> <p>Les NBT ne sont pas mentionnées dans les listes de techniques qui définissent le champ de la réglementation sur les OGM et dont la rédaction est antérieure à l'apparition de ces techniques. De ce fait, il n'est pas aujourd'hui juridiquement établi si l'utilisation de ces techniques doit ou non respecter le cadre réglementaire tel qu'il a été conçu pour les OGM : évaluation, autorisation, traçabilité, étiquetage et contrôle.</p> <p>Le Conseil d'Etat a interrogé la Cour de Justice de l'Union européenne (CJUE) sur le statut des nouvelles techniques de mutagenèse dirigée vis-à-vis de la directive 2001/18/CE et sur la possibilité pour les Etats membres d'adopter des mesures nationales pour encadrer les techniques exclues du champ d'application de la directive 2001/18/CE. Les conclusions de la CJUE pourraient être rendues d'ici la fin du printemps 2018.</p> <p>Le Haut conseil des biotechnologies (HCB) a publié le 2 novembre 2017 un avis sur les NPBT, en réponse à une saisine des ministères chargés de l'environnement et de l'agriculture. Les méthodes d'analyse des produits issus de NPBT font partie des questions étudiées. Ainsi, l'avis du Comité scientifique du HCB examine les possibilités de détection en fonction de la technique utilisée et des informations disponibles sur le produit.</p> <p>Dans le prolongement de l'avis du HCB, sans préjuger des décisions futures concernant l'encadrement réglementaire des produits issus de NPBT, il serait utile de disposer d'un avis du Laboratoire national de référence (LNR) pour la détection des OGM de l'ANSES sur les techniques actuellement disponibles pour la réalisation d'analyses relatives aux produits issus de NPBT.</p> | | |

A partir des différentes situations examinées dans l'avis du Comité scientifique du HCB (NPBT utilisée, informations disponibles sur le produit), il est demandé au LNR d'identifier les techniques actuellement disponibles qui permettraient au LNR de procéder à la détection, l'identification et la quantification des produits issus de NPBT. Il devra être tenu compte des exigences en termes d'accréditation et de performance des méthodes d'analyse liées aux analyses officielles ainsi que des contraintes telles que le coût et la durée de l'analyse.

S'agissant des cas où la détection, l'identification et la quantification ne seraient pas possibles actuellement dans le cadre d'analyses officielles de routine, il est demandé au LNR d'indiquer les possibilités et les perspectives de développement de méthodes adaptées et le cas échéant les besoins de mise au point ou de recherche.

Les deux autres laboratoires désignés LNR pour la détection des OGM seront informés et, s'ils le souhaitent, associés à ce travail.

Je vous saurais gré de bien vouloir me transmettre votre analyse pour fin juillet 2018.



Annexe 2 : Table récapitulative

| | Type de modification | PCR temps réel | PCR temps réel microfluidique | Génotypage SNP | Séquençage de fragments d'intérêts | Séquençage de génome complet | Etude de la méthylation de l'ADN | Conformation de la chromatine |
|---|------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Connaissance préalable des modifications | SDN1 | D-I-Q | D-I-Q | I | I | I | | |
| | SDN2 | D-I-Q | D-I-Q | I | I | I | | |
| | SDN3 | D-I-Q | D-I-Q | I | I | I | | |
| | Epigénétique | | | | | | I | I |
| Absence de connaissance préalable des modifications | SDN1 | | | | | | | |
| | SDN2 | | | | | | | |
| | SDN3 | | | | | I | | |
| | Epigénétique | | | | | | I | I |
| | Vecteurs et effecteurs | D-I-Q | D-I-Q | I | I | I | | |

D : détection ; I : identification ; Q : quantification



Techniquement au point



En cours de développement, niveau de performance incertain



Au point sur d'autres applications, niveau de performance incertain



Non applicable en routine à ce jour