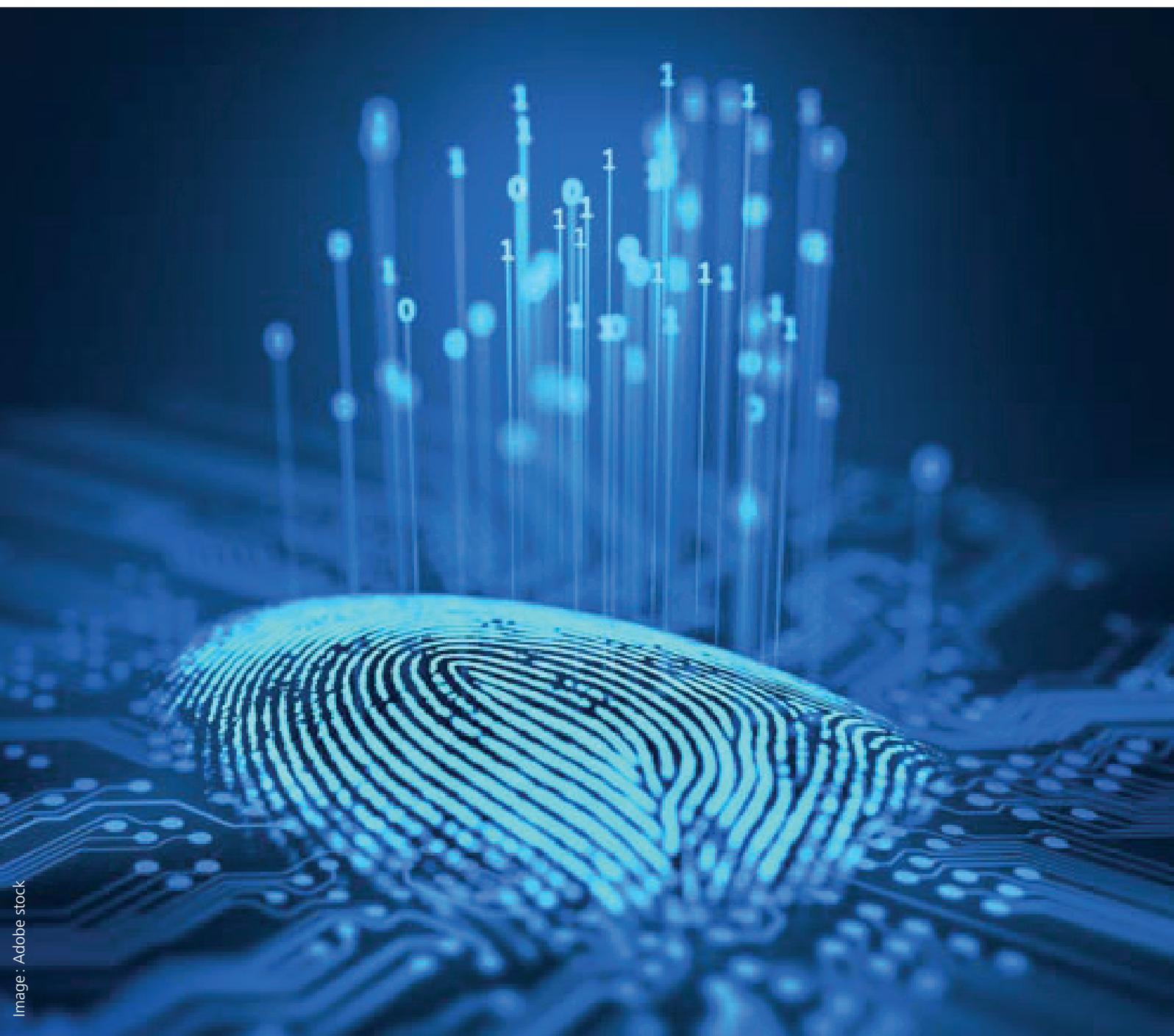


www.stopogm.ch

Fiche d'information sur les méthode de détection et de traçabilité des nouvelles techniques de génie génétique

Les nouvelles techniques de modification génétique sont détectables



L'agroindustrie prétend que les produits résultant des nouvelles techniques de modification génétique ne sont pas détectables

Les produits résultant des nouvelles techniques de modification génétique sont des OGM et sont donc soumis au droit européen du génie génétique. Cette décision a été rendue par la Cour de justice de la Communauté européenne (CJCE) en juillet 2018. En conséquence, la Commission européenne doit veiller à ce que des méthodes de détection soient également disponibles pour ces méthodes et les produits qui en sont issus. Et ces produits doivent pouvoir être étiquetés. Les experts du Réseau européen de laboratoires de référence pour les OGM (ENGL) travaillent actuellement sur une prise de position sur la détectabilité des modifications apportées par les nouvelles techniques de modification génétique. L'agro-industrie et les instituts de biotechnologie qui y sont liés tentent d'édulcorer la loi sur le génie génétique. Ils soutiennent que les procédés qui n'utilisent pas d'ADN recombinant devraient être exemptés des exigences en matière d'évaluation des risques, de détection et d'étiquetage. Ils argumentent que ces organismes et les produits qui en résultent ne sont ni identifiables ni traçables. Il serait donc impossible de les soumettre aux règlements de la Loi sur le génie génétique.

Mais il s'agit là d'un argument circulaire. Les partisans de la déréglementation partent du principe que les mutations produites par les nouvelles techniques de modification génétique ne peuvent pas être distinguées des mutations naturelles. De plus, les changements seraient créés de façon très ciblée et précise. Par conséquent, ils considèrent qu'il n'est pas nécessaire de chercher d'autres éléments permettant de les distinguer – même s'il est maintenant établi que l'édition du génome peut souvent causer des mutations indésirables et des effets dits non ciblés ou off-target. Cela conduit de nouveau à la conclusion que les mutations causées par les nouvelles techniques de modification génétique ne peuvent être distinguées d'une mutation naturelle.

Cependant, les nouvelles techniques de modification génétique laissent des marques à la fois générales et spécifiques (« signature ») dans le génome. Même si un élément isolé ne donne pas, à lui seul, une indication claire quant à l'intervention génétique, il est possible d'identifier la technique utilisée grâce à l'ensemble des traces laissées par ces dernières. Pour la plupart des produits issus de l'édition du génome, ces traces constituent une signature claire dans l'ADN. Les entreprises productrices sont au courant de tous les éléments d'identification des nouvelles techniques de modification génétique et de leurs produits puisqu'elles les utilisent déjà pour breveter leurs produits. Si elles divulguent ces signatures, les produits résultant des nouvelles techniques de modification génétique peuvent être facilement détectés à l'aide de la même technologie (PCR) que celle qui a été utilisée jusqu'à présent pour détecter les OGM « classiques ».

Un système de détection complet: une combinaison de signatures et d'informations de référence

En plus des méthodes de détection courantes (par ex. PCR multiplex, SNPlex) qui permettent un génotypage rapide, **il existe de nombreuses autres techniques qui permettent d'identifier tous les produits obtenus par les nouvelles techniques de modification génétique.** Contrairement aux affirmations de l'agro-industrie, il est même possible d'identifier les techniques utilisées et de distinguer, avec une forte probabilité, les mutations résultant de la mutagenèse in vitro des mutations naturelles.

La modification génétique en laboratoire s'effectue en plusieurs étapes. **Les étapes de préparation pour l'application des nouvelles techniques de modification génétique** sont les mêmes que pour le génie génétique classique. Elles **induisent des mutations et des épimutations qui laissent des cicatrices héréditaires qui sont détectables. Ces dernières accompagnées des effets spécifiques non ciblés causés par**

les nouvelles techniques de modification génétique forment des « cicatrices » dans l'ADN qui peuvent servir de moyen de détection. Il n'est pas possible d'éliminer complètement de telles cicatrices, même avec plusieurs rétrocroisements avec une variété élite. Une grande partie des traces reste dans le génome et constitue une sorte de signature qui peut être utilisée pour la traçabilité. De plus, les nouvelles techniques de modification génétique elles-mêmes laissent des traces spécifiques.

En plus de ces signatures génétiques traçables, il existe des informations documentées qui peuvent également être utilisées pour la traçabilité. En effet, la majorité des contrôles ne sont pas effectués en laboratoire, mais sur la base des déclarations d'origine. Les entreprises de semences ont également des produits résultant des nouvelles techniques de modification génétique protégés par des brevets. Sur la base du même principe, les laboratoires chargés de l'identification et du suivi de ces produits pourraient mettre au point un système de détection. De tels efforts ont déjà été entrepris notamment dans les laboratoires de référence de l'Union européenne. Si les nouvelles techniques de modification génétique sont soumises à la législation sur le génie génétique, les entreprises semencières devraient fournir des informations de référence et les rendre disponibles au niveau international via des bases de données. Ces informations constituent la pierre angulaire d'une traçabilité rapide et fiable des OGM. C'est la seule manière de garantir la liberté de choix des consommateurs.

Si les laboratoires utilisent toutes ces informations ensemble dans une approche dite matricielle, comme les autorités le font depuis des années pour les OGM transgéniques inconnus, **ils peuvent identifier de manière univoque chaque technologie et chaque produit résultant des nouvelles techniques de modification génétique.** Plus on dispose de telles informations, plus le degré de certitude est élevé.

Exemple

Dans un champ, on découvre un colza résistant à un herbicide à base de glyphosate. La présence de la plante soulève de nombreuses questions qui doivent être clarifiées. D'où vient-elle? Présente-t-elle un transgène, une mutation? Cette mutation est-elle d'origine naturelle ou génétique? Quelle technique a été utilisée?

1. Il faut d'abord collecter toutes les informations concernant la plante. Cela comprend notamment des informations sur l'emplacement et la production de la plante, l'origine commerciale de la semence et l'histoire du champ.
2. Dans un deuxième temps, une méthode de détection telle que la PCR peut clarifier l'origine de la mutation dans le gène responsable de la résistance aux herbicides. Cette étape peut permettre de déterminer l'origine (transgène ou non, insertion ou suppression [deletion]) de la mutation.
3. Dans un troisième temps, en cas de doute ou si le nombre de signatures est insuffisant, les techniciens de laboratoire peuvent tenter d'identifier d'autres signatures génétiques ou épigénétiques. En comparant avec des bases de données qui contiennent des signatures provenant de différentes techniques de modification, il est possible de détecter des correspondances et des différences avec des signatures connues provenant de différentes techniques. Ces bases de données sont fondées sur des informations provenant de brevets, d'articles scientifiques et de données issues de l'échange d'informations et de matériaux entre laboratoires de contrôle. Il incombe donc aux laboratoires de recherche et de contrôle de collecter ces éléments de signature dans leurs bases de données. Cela permet de mettre à disposition, dans un avenir proche, des caractéristiques d'identification uniques. La recherche devrait s'efforcer de fournir des méthodes et des protocoles pour distinguer chaque technique et chaque produit. Selon la directive, ces signatures devraient ensuite être mises à la disposition du réseau européen de laboratoires existant.

Comment fonctionne l'approche matricielle ?

L'approche matricielle est fondée sur un réseau convergent de données probantes. Ce principe est utilisé universellement. L'exemple d'application le plus connu est l'identification à l'aide de caractéristiques biométriques telles que les empreintes digitales. Un scanner lit les empreintes digitales d'une personne et convertit le résultat en informations numériques pour qu'un ordinateur puisse les interpréter et les vérifier. Une seule ramification de la peau sur la face inférieure du bout du doigt ne suffit pas pour identifier une personne de manière univoque. C'est l'ensemble de ces ramifications et leur répartition au sein d'une empreinte digitale qui permet d'attribuer de manière univoque l'empreinte à un être humain.

L'identification des nouvelles techniques de modification génétique et de leurs produits repose sur un principe similaire. Ici aussi, la détermination repose sur l'utilisation combinée de différentes méthodes et caractéristiques. Ces informations servent, entre autres, à clarifier l'histoire de l'évolution des organismes, en termes de taxonomie, de phylogénie, de statistique, d'identification des variétés, de sélection assistée par marqueurs ou de détection des OGM transgéniques. L'identification est effectuée par divers outils statistiques, bases de données ou programmes « intelligents » – appelés intelligence artificielle – tels que les systèmes d'aide à la décision (Decision Support Systems, DSS).

Une compilation du plus grand nombre d'informations possible sur les nouvelles techniques de modification génétique et les OGM provenant de sources indépendantes permet de déterminer la technologie utilisée dans le processus de production, puis de suivre le produit en reliant ces informations (sélectionnées en fonction des besoins des laboratoires: par exemple, les coûts ou la rapidité). Cette approche matricielle est déjà utilisée pour détecter les OGM transgéniques connus ou inconnus. Elle réduit les coûts et simplifie la détection d'échantillons complexes. L'utilisation de bases de données de laboratoires et de DSS rend l'approche matricielle de plus en plus conviviale.

À la recherche de traces avec l'intelligence artificielle

De nouvelles recherches montrent que les algorithmes de deep learning peuvent considérablement limiter la probabilité d'erreur sur l'identité du laboratoire d'origine des processus de génie génétique effectués.

Une seule caractéristique ne permet pas encore de désigner le laboratoire d'origine. Pour y parvenir, il faut une combinaison de propriétés de caractéristiques dont l'occurrence commune est individuelle et trahit donc le concepteur. Pour identifier ces éléments, on utilise des réseaux neuronaux artificiels qui peuvent reconnaître les signatures « traîtresses » dans les séquences d'ADN. Ce système de traitement de l'information est typiquement utilisé pour classer les images dans différentes catégories. Sa structure et son principe de fonctionnement rappellent ceux du système nerveux humain. Le réseau est constitué de neurones artificiels qui sont reliés entre eux et échangent des informations. Les connexions entre les neurones individuels ont une pondération qui est ajustée pendant le processus d'entraînement afin qu'un réseau correctement formé réponde correctement à un modèle reconnaissable. Pendant l'entraînement, le réseau neuronal est alimenté avec des séquences d'ADN provenant de laboratoires connus (« données d'entraînement »).

Plus la base de données est grande et étendue, plus l'entraînement est efficace. En fin de compte, le modèle fini doit encore être validé. Il s'agit alors d'ajouter d'autres séquences d'ADN, mais pas celles qui ont été utilisées pour construire le modèle. Cette manière de faire permet de déterminer si le réseau parvient à attribuer de façon consistante des séquences d'ADN à leurs laboratoires d'origine.

Quelles signatures utiliser ?

Signatures des techniques préparatoires

Ce ne sont pas seulement les modifications génétiques qui indiquent l'origine non naturelle d'une mutation. Avant de modifier le génome d'une plante, les cellules végétales doivent être cultivées en laboratoire (in vitro) et préparées pour l'introduction du matériel qui doit induire les changements souhaités. Les processus préparatoires sont stressants pour les cellules. Chez tout organisme, ce stress laisse des cicatrices héréditaires dans le noyau cellulaire ou dans les organelles. Le motif de ces cicatrices est identifiable et traçable.

L'approche matricielle permet de combiner ces effets génétiques et épigénétiques non ciblés et non intentionnels avec les « empreintes » spécifiques des nouvelles techniques de modification génétique. Cela indique que la plante a été génétiquement modifiée in vitro d'une manière ou d'une autre. Cette méthode n'est pas nouvelle; les mêmes techniques préparatoires sont déjà utilisées dans le génie génétique « classique » depuis des décennies à des fins d'identification et de suivi.

Les étapes préparatoires les plus importantes, dont les traces peuvent indiquer l'application d'une procédure de modification génétique, sont les suivantes :

>> Préparation de la cellule à la transformation – Protoplastisation

Avant d'introduire du matériel génétique dans les cellules, il faut les préparer pour l'absorption du matériel. Chez les plantes, il s'agit de casser ou d'enlever la paroi cellulaire. Il en résulte ce que l'on appelle des protoplastes. Ce sont des cellules sans paroi cellulaire qui sont prêtes pour la transformation. Elles peuvent accueillir divers outils moléculaires tels que de grandes protéines (Cas9), des ARN ou des fragments d'ADN. Mais la production de protoplastes entraîne des mutations et des épimutations.

>> Culture cellulaire

La deuxième étape est la culture de ces protoplastes. Ce processus entraîne également des modifications génotypiques et phénotypiques (appelées variations somaclonales) par rapport à la plante originale, surtout après de longs cycles de culture in vitro sans régénération. Des mutations et des épimutations se produisent. Le potentiel de variabilité qui en résulte a longtemps été utilisé en sélection végétale classique pour accroître la variabilité génétique.

>> Introduction du matériel génétique dans les cellules cibles – Vectorisation

L'étape suivante consiste à introduire le matériel biologique dans la cellule cible pour y produire le changement voulu. Selon la technique, ce matériel biologique est constitué de protéines et/ou de séquences de gènes telles que les ARN et les ADN codants sous forme d'oligonucléotides, de plasmides (insertion de séquences d'ADN avec *Agrobacterium tumefaciens* utilisée comme vecteur, également appelée transfection) ou de virus. Cela nécessite de découper de grandes ouvertures dans les membranes (membrane cellulaire et membrane nucléaire). Les techniques utilisées dans ce but déclenchent des réactions de stress et entraînent à leur tour des mutations et des épimutations involontaires.

Signatures spécifiques des nouvelles techniques de modification génétique

Un grand nombre de signatures et de cicatrices spécifiques à l'utilisation des nouvelles techniques de modification génétique sont connues.

L'utilisation de ciseaux génétiques (enzymes de coupe/nuclease) tels que CRISPR/Cas9 induit des changements traçables (*indels*) avec des modèles spécifiques. De telles nucléases qui ciblent une séquence choisie sur l'ADN (*Site-Directed Nuclease, SDN*) nécessitent une séquence de reconnaissance spéciale pour pouvoir se lier à l'ADN cible. Si les apparitions de mutations ciblées ou d'effets non ciblés se multiplient à proximité de telles séquences de reconnaissance, cela indique spécifiquement la technique utilisée. Il devrait même être possible de reconnaître quel type de nucléase a été utilisé. Cela peut permettre de confirmer une suspicion quant à l'origine artificielle d'une mutation ciblée.

Selon le type de technique utilisée, il peut être nécessaire de rechercher différentes signatures. L'observation scientifique et technologique menée par les laboratoires ENGL depuis deux décennies doit donc être développée et reste pertinente.

Au lieu de concentrer le contrôle exclusivement sur le changement induit intentionnellement, il faut également prendre en considération les effets non ciblés (mutations et épimutations) plus éloignés du site modifié.

Scénario possible pour l'application systématique de l'approche matricielle aux produits résultant des nouvelles techniques de modification génétique

Les bases de données et les aides à la décision sont nécessaires comme point de départ. Les entreprises devraient donc être tenues de fournir des méthodes de détection, des procédures d'identification et du matériel de référence, comme elles le font déjà pour les OGM transgéniques. Cela permettrait d'accélérer la mise en œuvre des procédures validées. Les bases de données seraient d'abord remplies d'un aperçu des brevets délivrés ou demandés par les entreprises. Toutefois, à plus long terme, ces bases de données évolueront pour contenir un plus grand nombre d'éléments qui fonctionnent directement ou indirectement comme des « signatures » et peuvent être utilisés comme moyen de détection. Est-ce que ça coûterait cher ? Dans la plupart des cas, ces techniques ne seraient utilisées que dans le cadre d'une première étape, pour déterminer si des changements existent, et non pour identifier les techniques ou leurs propriétaires. Une méthode de détection de ce type ne serait pas onéreuse. En outre, les coûts du séquençage à haut débit ont tendance à diminuer. Ce n'est que lorsqu'un changement est détecté qu'une analyse plus complexe est effectuée pour identifier la technologie.

Définitions

Mutation et épimutation

Une mutation est un changement dans l'information génétique (ADN ou ARN) d'un organisme. Les mutations sont héréditaires et peuvent altérer l'expression d'un ou de plusieurs gènes et donc altérer les produits génétiques.

Les gènes doivent être actifs, c'est-à-dire activés, pour pouvoir constituer leurs produits. C'est la condition pour que l'ARN messager (ARNm) puisse se former et que la protéine soit produite sur la base de ces informations. Lorsque ces produits génétiques ne sont plus nécessaires, les gènes doivent être immobilisés, c'est-à-dire désactivés. L'épigénétique s'intéresse aux changements moléculaires qui sont à l'origine de cet effet, et qui conduisent au développement d'un modèle de gènes actifs et inactifs à l'échelle du génome. Les mutations épigénétiques, aussi appelées épimutations, influencent l'expression d'une séquence génétique, mais ne sont pas dues à un changement dans la séquence nucléotidique elle-même. Elles sont plutôt causées par un changement dans la composition chimique des nucléotides.

Chaque changement de séquence est accompagné d'une signature épigénétique. L'épigénétique fonctionne comme une mémoire cellulaire qui stocke les traces de tout stress, y compris le stress généré par les manipulations génétiques.

Indel

Le mot « indel » est la contraction *d'insertion et de deletion*. Ce terme désigne une mutation du génome qui a été produite soit par *insertion* (incorporation de nucléotides supplémentaires dans la séquence d'ADN) soit par *deletion* (suppression d'un nucléotide). Le terme résume les deux types de mutations. Il est surtout utilisé lorsque ces mutations sont impossibles à distinguer par leurs effets similaires ou qu'elles sont identiques dans leur résultat.

Intelligence artificielle

Le terme « intelligence artificielle » désigne les programmes intelligents qui traitent certaines tâches complexes qui exigent un haut degré d'intelligence pour être accomplies. Ces programmes maîtrisent parfois mieux les tâches complexes que les humains. Ce terme générique couvre des méthodes telles que les réseaux neuronaux artificiels, le *deep learning* et les systèmes d'aide à la décision (*Decision Support Systems*).

Références

Bertheau, Y. (2018) New breeding techniques: Detection and identification of the techniques and derived products. Reference Module in Food Science. New York (USA): Elsevier Science inc (1), 2019. 320-336

Detection of food and feed obtained by new plant mutagenesis techniques. European Network of GMO Laboratories (ENGL) http://db.zs-intern.de/uploads/1549640768-Genome%20editing%20report_final%20version%20ENGL.pdf

Nachweisverfahren und Probenahme für die Überwachung nach dem Gentechnikrecht https://www.bvl.bund.de/DE/06_Gentechnik/02_Verbraucher/05_NachweisverfahrenKontrollen/gentechnik_NachweisverfahrenKontrollen_node.html#doc1843366bodyText1