

Briefing sur la biosécurité



Décembre 2020

Pourquoi les organismes issus de l'édition génomique ne sont pas exclus du Protocole de Cartagena sur la biosécurité

Par **Eva Sirinathsinghji**

De nouvelles techniques émergentes d'édition du génome sont promues comme méthodes plus rapides pour génétiquement modifier l'information et l'expression génétiques au sein de régions ciblées du génome. Ces techniques comprennent les courtes répétitions palindromiques régulièrement espacées (CRISPR), les méganucléases (MN), les nucléases à doigt de zinc (ZFN), les nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN) et la mutagenèse dirigée par oligonucléotides (ODM). Le développement de ces techniques a suscité d'intenses débats quant à savoir (1) si elles sont réglementées par la législation actuelle en matière de biosécurité, (2) si elles sont sûres et (3) si elles doivent être soumises aux mêmes procédures d'évaluation

et de gestion des risques que les organismes vivants modifiés (OVM).

Un des arguments avancés par ceux qui cherchent à exclure les organismes issus de techniques d'édition génomique de la réglementation, y compris au niveau national, est que les organismes issus de techniques d'édition génomique n'entrent pas dans la définition d'un OVM au sens du Protocole de Cartagena sur la biosécurité de la Convention sur la diversité biologique (CDB).

Ce document vise à montrer que les technologies et applications d'édition génomique actuellement déployées, y compris toutes les techniques impliquant des systèmes basés

TWN LE RÉSEAU TIERS-MONDE (THIRD WORLD NETWORK, TWN) est une organisation internationale indépendante à but non lucratif de recherche et de défense des droits, qui s'emploie à mieux articuler les besoins, les aspirations et les droits des peuples du Sud et à promouvoir un développement juste, équitable et écologique.

Adresse : 131 Jalan Macalister, 10400 Penang, MALAISIE **Tél** : 60-4-2266728/2266159

Fax : 60-4-2264505 **Courriel** : twn@twnetwork.org **Site web** : www.twn.my



GENEWATCH UK est un groupe de recherche politique et d'intérêt public à but non lucratif. Le groupe étudie l'impact de la science et des technologies génétiques sur notre alimentation, notre santé, notre agriculture, notre environnement et notre société.

Adresse : 53 Milton Rd, Cambridge CB4 1XA, ROYAUME-UNI. **Tél** : +44 (0)330 0010507

Courriel : mail@genewatch.org **Site web** : www.genewatch.org

Le contenu de cette publication peut être republié ou réutilisé gratuitement à des fins non commerciales, sauf indication contraire. Cette publication est sous licence Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International Licence.

sur le CRISPR, entrent clairement dans la définition du Protocole donnée à un OVM, que celles-ci impliquent l'insertion, la suppression ou l'édition de séquences de génomes.

La définition d'un « organisme vivant modifié » dans le cadre du Protocole de Cartagena

L'article 3 du protocole de Cartagena fournit trois définitions qui sont interdépendantes et doivent être lues ensemble : « organisme vivant modifié », « organisme vivant » et « biotechnologie moderne ».

On entend par « organisme vivant modifié » « tout organisme vivant qui possède une combinaison de matériel génétique inédite obtenue par recours à la biotechnologie moderne ».

Un organisme vivant modifié est donc défini dans le Protocole comme comprenant uniquement les organismes vivants qui :

- contiennent de nouvelles combinaisons de matériel génétique ; et
- ont été produits en utilisant les techniques de la biotechnologie moderne (paragraphe 208, *An Explanatory Guide to the Cartagena Protocol on Biosafety (Guide explicatif du Protocole de Cartagena sur la biosécurité)* : Mackenzie et al., 2003).

On entend par « organisme vivant » « toute entité biologique capable de transférer ou de répliquer du matériel génétique, y compris des organismes stériles, des virus et des viroïdes ».

Tandis que le Protocole de Cartagena ne définit pas la « ressource génétique », la CDB le définit ainsi : « tout matériel d'origine végétale, animale, microbienne ou autre, contenant des unités fonctionnelles de l'hérédité ». Par unités fonctionnelles de l'hérédité, on entend les acides nucléiques contenant des informations génétiques. Dans le contexte du Protocole de Cartagena, les ressources génétiques peuvent être comprises comme désignant les acides nucléiques qui contiennent des unités fonctionnelles de l'hérédité (paragraphe 201, *Guide explicatif*).

Une « nouvelle combinaison de ressources génétiques » peut être considérée comme une combinaison dont l'existence n'était pas connue au moment où elle a été produite pour la première fois. Mis en rapport avec la définition de la CDB de ce que constitue le matériel génétique, cela peut alors être compris comme une nouvelle combinaison d'acides nucléiques contenant des unités fonctionnelles de l'hérédité (paragraphe 209, *Guide explicatif*). Il est important de noter que la nouvelle combinaison se rapporte uniquement à une combinaison de ressources génétiques, même si cela n'entraîne pas de changement observable (paragraphe 210, *Guide explicatif*).

La nouveauté d'une combinaison pourrait résulter d'une nouvelle forme d'unité fonctionnelle de l'hérédité, par exemple, résultant d'un changement qui modifie, dans son ensemble, la séquence des nucléotides à l'intérieur de l'unité, que ce soit par altération, insertion ou suppression d'un ou plusieurs nucléotides. La nouveauté pourrait également résulter d'un nouvel arrangement des unités fonctionnelles de l'hérédité, par exemple l'introduction de matériel génétique d'espèces différentes ou le réarrangement des ressources génétiques d'une même espèce. Une combinaison nouvelle pourrait résulter d'un seul changement au sein d'une séquence de nucléotides ou de changements beaucoup plus importants (paragraphe 211-212, *Guide explicatif*).

Selon le protocole de Cartagena, la nouvelle combinaison de matériel génétique doit être « obtenue par l'utilisation de la biotechnologie moderne ». Ceci est un critère fondamental dans la définition d'un OVM. Le fait qu'un organisme soit ou non un OVM au sens du Protocole dépend du fait que la « biotechnologie moderne » soit ou non utilisée pour créer une nouvelle combinaison de ressources génétiques.

La « biotechnologie moderne » est définie comme suit dans le Protocole de Cartagena :

« L'application de :

- a. techniques in vitro de production d'acide nucléique, y compris la recombinaison de l'ADN et l'injection directe d'acide nucléique dans des cellules ou organites, ou
- b. la fusion de cellules au-delà de la famille taxonomique,

qui franchissent les barrières naturelles de la reproduction ou de la recombinaison physiologique et qui ne sont pas des techniques utilisées dans la reproduction et la sélection traditionnelles ».

Cela comprend donc, sans s'y limiter, les techniques *in vitro* d'acide nucléique appliquées à l'insertion, la suppression et la modification des ressources génétiques (paragraphe 215, *Guide explicatif*). Les deux qualifications sont d'une part, que les barrières physiologiques naturelles de la reproduction ou de la recombinaison doivent être franchies, et d'autre part, qu'il ne s'agit pas de techniques utilisées dans la sélection et la reproduction traditionnelles.

En résumé, pour qu'un organisme vivant soit défini comme un OVM au titre du Protocole de Cartagena, il doit remplir trois critères :

1. l'organisme contient de nouvelles combinaisons de ressources génétiques ;
2. il a été produit par le biais d'un recours aux techniques de la biotechnologie moderne (y compris l'application de techniques *in vitro* d'acide nucléique, ou la fusion de cellules n'appartenant pas à la famille taxonomique) ; et
3. les techniques biotechnologiques modernes utilisées ont franchi les barrières naturelles de la reproduction ou de la recombinaison physiologique et ne sont pas des techniques utilisées dans la sélection et la reproduction traditionnelles.

Critère 1 : l'organisme contient de nouvelles combinaisons de matériel génétique

Pour les systèmes basés sur le CRISPR, la technique implique l'utilisation de séquences d'ARN guide (ARNg) qui sont produites synthétiquement pour cibler une séquence d'ADN (ou d'ARN) d'intérêt pour « l'édition ». L'ARNg dirige ensuite l'enzyme de coupure de l'ADN Cas9, ou endonucléase, vers la séquence d'intérêt, où il coupe ensuite l'ADN. Une fois l'ADN coupé, le mécanisme de réparation de l'ADN de la cellule est activé et l'ADN est réparé. Si le processus de réparation entraîne l'insertion ou la suppression de petits morceaux de matériel génétique

(« indels »), le résultat est appelé application de la nucléase dirigée par le site (SDN) 1. Les applications SDN-1 sont utilisées pour détruire des gènes de manière imprécise. Par ailleurs, si l'intention est « d'éditer » un gène, de l'ADN supplémentaire est également introduit, lequel fournit le modèle de l'altération souhaitée qui peut ensuite être copiée dans le gène de l'organisme cible. C'est ce que l'on appelle le SDN-2. Les systèmes basés sur le CRISPR sont également utilisés pour insérer de l'ADN transgénique dans un site cible, en introduisant un modèle d'ADN aux côtés du mécanisme du CRISPR. On fait alors référence au SDN-3.

De même, les TALEN, MN et ZFN peuvent être conçus pour réaliser des applications SDN-1, -2 et -3 « d'indels », d'édition ou d'insertion de séquences d'ADN transgénique. Toutefois, ceux-ci diffèrent des systèmes basés sur le CRISPR en ce qu'ils ne déploient pas d'ARNg en vue de cibler des séquences d'ADN spécifiques, mais sont plutôt des enzymes à base de protéines dotés de sites de reconnaissance de l'ADN ayant vocation à se lier et à couper des séquences d'ADN particulières d'intérêt.

L'ODM, en revanche, implique l'introduction de courtes sections d'ADN, appelées oligonucléotides, soient des hybrides d'oligonucléotides ADN/ARN. Ces oligonucléotides sont identiques à la séquence cible à modifier, excepté pour l'altération que l'on souhaite introduire. Ces modèles d'ADN se lient à la séquence cible, après quoi le mécanisme naturel de réparation de la cellule reconnaît l'inadéquation entre son propre ADN et celui du modèle de réparation.

L'objectif d'ensemble de toutes les techniques d'édition du génome est l'introduction de modifications génétiques jusqu'alors inexistantes, de manière à générer de nouveaux traits au sein des organismes vivants, que de l'ADN ait été inséré ou non. Que ces techniques soient mises en œuvre pour générer des « indels », des « éditions » ou des « insertions », toutes visent à générer de nouveaux traits en générant de nouvelles combinaisons d'ADN, que de l'ADN transgénique soit effectivement inséré ou non.

Il est donc clair que **toutes** les techniques d'édition du génome produisent une nouvelle combinaison de matériel génétique, et qu'elles remplissent donc le premier critère.

Critère 2 : l'utilisation de la biotechnologie moderne (y compris l'application de techniques in vitro d'acide nucléique, ou la fusion de cellules n'appartenant pas à la famille taxonomique)

À l'heure actuelle, la grande majorité des techniques d'édition du génome implique l'application de techniques d'acide nucléique, impliquant l'utilisation d'acides nucléiques d'ARN ou d'ADN à un stade donné du processus.

Les techniques basées sur le CRISPR (y compris les double-nickases et les « éditeurs » de base) peuvent être réalisées de différentes manières, qui impliquent toutes l'introduction d'acides nucléiques d'ADN (acronyme d'acide désoxyribonucléique) ou d'ARN (acronyme d'acide ribonucléique). L'approche traditionnelle consiste à introduire des plasmides d'ADN qui codent pour la machinerie CRISPR. En d'autres termes, le plasmide est introduit de manière permanente dans le génome de l'organisme cible et peut ensuite être retiré par rétrocroisement, c'est-à-dire qu'il peut être exprimé de manière transitoire. Des techniques plus récentes opérant sans ADN ont été développées, qui impliquent soit l'introduction de molécules d'ARN messager qui codent pour la machinerie CRISPR, soit l'introduction directe de ribonucléoprotéides constituées de la protéine Cas9 avec la molécule d'ARN guide (Metje-Sprink et al., 2019).

Comme pour les techniques basées sur le CRISPR, les méthodes classiques TALEN, ZFN et MN impliquent l'introduction de plasmides d'ADN qui expriment chacun et de manière respective des TALEN, ZFN ou MN, lesquels sont soit introduits de manière permanente dans le génome de l'organisme cible (et retirés ultérieurement si souhaité), soit de manière transitoire. Il a également été démontré la possibilité que l'ARN messager

effectue du code pour la machinerie TALEN dans les cellules végétales (Stoddard et al., 2016).

Des exceptions limitées ont été démontrées en laboratoire en utilisant des TALEN et des MN (Luo et al., 2015), où l'apport direct des formes protéiques respectives des nucléases a été effectuée dans les plantes pour générer un organisme dont le génome a été modifié. Bien que l'on puisse dire que ces méthodes ne remplissent pas le critère 2, celles-ci sont actuellement beaucoup moins efficaces que l'apport de plasmides d'ADN et il est peu probable qu'elles soient largement utilisées.

Les techniques ODM peuvent être réalisées en introduisant directement les oligonucléotides dans le génome de l'organisme cible, lesquels peuvent être sous formes d'ADN ou d'hybrides d'ADN/ARN.

Les techniques basées sur le CRISPR, le ZFN et l'ODM impliquent toutes l'utilisation d'acides nucléiques (soit de l'ADN, de l'ARN ou des hybrides d'ADN/ARN) pour effectuer des fonctions d'édition génomique, et remplissent donc le critère 2. La plupart des techniques TALEN et MN, à quelques exceptions près, impliquent l'utilisation d'acides nucléiques (soit des hybrides d'ADN ou d'ARN) pour effectuer des fonctions d'édition génomique, et remplissent donc le critère 2.

En outre, même si la nouvelle combinaison de matériel génétique obtenue par la biotechnologie moderne est ensuite transférée dans un autre organisme par le biais de techniques traditionnelles de sélection ou de reproduction, l'organisme qui en résulte est également un OVM au sens du Protocole (paragraphe 214, *Guide explicatif*). Une telle définition inclurait donc les organismes issus de l'édition génomique qui introduisent une cassette d'ADN permettant de coder des nucléases qui est ensuite retirée par le biais de la sélection traditionnelle (comme c'est souvent le cas avec les CRISPR, TALEN, ZFN et MN), ce qui remplirait le critère 2, dans la mesure où l'étape précédente aurait déjà impliqué l'application de techniques d'acide nucléique pour générer une nouvelle combinaison de matériel génétique.

Le critère 2 vise à garantir que le processus, et pas seulement le résultat, est réglementé

Il est essentiel de souligner que le critère 2 garantit que le processus, et non le résultat, est réglementé et évalué, afin de permettre la détection d'effets non désirés, dont certains savent la distinction théorique entre les applications de l'ODM, et de la SDN-1, -2 et -3. Des insertions involontaires de matériel génétique ont été détectées, à la fois sur les sites cibles et hors cible (Li et al., 2015 ; Liang et al., 2017 ; Ono et al., 2019 ; Norris et al., 2020 ; Skryabin et al., 2020), un effet qui est associé à toutes les nucléases qui introduisent des cassures double brin de l'ADN (y compris CRISPR, TALENs, ZFNs et MNs). Ainsi, bien que l'intention de l'ODM, du SDN-1 ou du SDN-2 n'implique pas l'insertion permanente d'ADN, les preuves actuelles suggèrent que cela peut souvent être un résultat théorique plutôt que pratique.

Parmi les autres effets non désirés documentés figurent les modifications hors cible dans d'autres parties du génome, par exem-

ple les mutations, les réarrangements complexes à grande échelle, les translocations, les insertions et les suppressions, ainsi que la production de nouvelles protéines (Wolt et al., 2016 ; Mou et al., 2017 ; Shin et al., 2017 ; Zhu et al., 2017 ; Kosicki et al., 2018 ; Tuladhar et al., 2019). Même les altérations d'un seul nucléotide peuvent avoir des répercussions sur la fonction d'un gène, que ce soit à l'endroit ciblé ou à tout autre endroit non ciblé.

En outre, le processus d'édition génomique implique généralement des supports techniques qui sont identiques aux anciennes techniques de transgénèse, y compris la transformation de cellules mises en culture. Ces processus sont associés à des effets non désirés tels que des suppressions et des réarrangements (voir, par exemple, Kim et al., 2003 ; Latham et al., 2006 ; Makarevitch et al., 2003 ; Rang et al., 2005 ; Windels et al., 2003).

Critère 3 : les techniques de biotechnologie modernes utilisées ont passé outre les barrières naturelles de la reproduction ou de la recombinaison physiologique et ne sont pas des techniques utilisées dans la reproduction et la sélection traditionnelles

Il est clair que les techniques d'édition génomique ne sont pas des techniques utilisées dans la sélection et la reproduction traditionnelles. Ces organismes fruit de l'édition génétique sont générés sans qu'aucune reproduction n'ait lieu, par l'utilisation de techniques biotechnologiques modernes pour introduire des changements génétiques. Il est également évident qu'elles contournent les barrières naturelles de la reproduction ou de la recombinaison, l'édition du génome permettant des modifications qui ne se produiraient pas naturellement (voir l'étude de Kawall, 2019).

Comme détaillé ci-dessous, les techniques décrites peuvent être utilisées pour effectuer une ou plusieurs modifications qui permettent de passer outre les barrières naturelles de la reproduction ou de la recombinaison.

L'un des principaux avantages offerts aux développeurs d'OVM est la possibilité d'utiliser l'édition génomique pour effectuer des modifications simultanées ou successives du matériel génétique, une application appelée multiplexage. De nombreux traits végétaux sont régis par une multitude de gènes. Les techniques CRISPR, TALENs, ZFNs et MNs offrent maintenant un moyen de cibler plusieurs gènes à la fois, ou des copies multiples d'un même gène (ainsi que des paralogues), ce qui n'a pas encore été réalisé avec les techniques conventionnelles de sélection, de mutagenèse chimique ou transgéniques à ce jour (par exemple, voir Kawall, 2019 ; Ran et al., 2018 ; Wang et al., 2018 ; Li et al., 2018 ; Qi

et al., 2016 ; Cai et al., 2018 ; Bao et al., 2015 ; Suzuki et al., 2013 ; Hauschild et al., 2011). L'altération de toutes les copies d'un gène est très importante pour les plantes, de nombreuses espèces ayant des copies multiples d'un gène en raison de la polyploïdie (soit la possession de plus de deux copies de chaque chromosome) ou de la redondance génétique (soient des copies multiples d'un gène). Ni la sélection conventionnelle ni les mutations naturelles ne sont capables de modifier toutes les copies d'une séquence génétique. En théorie, de telles altérations sont possibles, même si les démonstrations de multiplexage de différents gènes ou de copies multiples de gènes avec la MO semblent actuellement limitées (Jansing et al., 2019).

L'édition génomique permet en outre de générer des mutations dans des régions du génome qui sont habituellement protégées par des mécanismes de réparation de l'ADN existant naturellement. La variation génétique se produit naturellement dans les organismes en raison de nombreux mécanismes. Les mutations peuvent survenir spontanément à la suite de facteurs environnementaux externes, par exemple suite à une exposition aux rayons UV du soleil ou à des substances mutagènes, ou en interne à la suite d'erreurs commises lors de la réplication de l'ADN ou de sous-produits métaboliques mutagènes, par exemple dans le cas d'espèces réactives à l'oxygène. Les mutations résultant de ces facteurs déclenchent des mécanismes de réparation de l'ADN, qui se traduisent par une protection préférentielle de régions particulières de l'ADN, telles que celles contenant des gènes. Les mécanismes de réparation de l'ADN fonctionnent donc de manière à empêcher l'accumulation excessive de mutations dans les régions de l'ADN où les séquences doivent être conservées pour maintenir leurs fonctions clés, par exemple les séquences codant pour les gènes. Les techniques d'édition génomique prennent donc le pas sur les mécanismes de réparation endogènes avec la possibilité de modifier les séquences génétiques conservées. En outre, il est prouvé que les mutations résultant des techniques d'édition génomique ne sont pas réparées par les mêmes processus que ceux qui se sont produits naturellement, avec des taux d'erreur élevés dans la réparation des mutations induites par le CRISPR (Brinkman

et al., 2018). Les systèmes CRISPR/Cas ont été utilisés pour modifier des séquences conservées, par exemple lorsqu'ils ont été appliqués aux technologies du forçage génétique (Kyrou et al., 2018). Il a également été démontré que les TALEN, ainsi que les ZFN, ciblent les séquences conservées (Suzuki et al., 2013 ; Bilichak et al., 2020).

Une variation génétique naturelle est également générée lors de la méiose, la production de gamètes tels que les spermatozoïdes et les ovules. La méiose, un processus biologique fondamental, est responsable de la variation génétique des organismes sexuellement reproductifs en recombinant le contenu génétique hérité des deux parents. L'échange de matériel génétique entre les chromosomes au cours de ce processus se produit de manière non aléatoire, dans des régions définies des chromosomes, parfois appelées les « points chauds » de la recombinaison. En revanche, l'édition génomique permet de modifier l'ADN dans des régions dites « points froids », surmontant ainsi ces limites naturelles. Le CRISPR/Cas a été utilisé pour surmonter les effets d'entraînement de liaison lorsque des gènes désirables sont liés à des gènes indésirables dans des régions peu recombinantes (Roldan et al., 2017 ; Soyk et al., 2017). Qui plus est, le CRISPR est à l'étude pour la manipulation des événements de recombinaison méiotique en vue d'accroître la diversité génétique des cultures ; mais la recherche et le développement en la matière semblent encore en être à leurs prémises (Taagen et al., 2020).

En résumé, toutes les techniques d'édition génomique permettent de passer outre les barrières naturelles de la reproduction et de la recombinaison par une multitude de mécanismes. Celles-ci ne sont pas non plus des techniques utilisées dans la sélection et la reproduction traditionnelles, et remplissent donc le critère 3.

Remerciements

Je remercie le Dr Sarah Agapito-Tenfen de GenØk du Centre pour la biosécurité en Norvège et les collègues du Réseau Tiers-Monde pour es révisions apportées à ce document.

Ce briefing a été réalisé grâce à une contribution financière partielle de SwedBio et du Stockholm Resilience Centre.

Le Dr Eva Sirinathsinghi est titulaire d'un doctorat en neurogénétique. Ayant reçu une formation en sciences biomédicales, elle est chercheuse sur les questions de biosécurité. Son travail appuie les campagnes de la société civile sur les risques posés par les technologies de génie génétique, y compris les nouvelles technologies de génie génétique.

Bibliographie

Bao Z, Xiao H, Liang J, Zhang L, Xiong X, Sun N, Si T, Zhao H (2015). Homology-integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) system for one-step multigene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth. Biol.* 4(5): 585-594. doi: 10.1021/sb500255k. Epub 2014 Sep 19. PMID: 25207793.

Bilichak A, Sastry-Dent L, Sriram S, Simpson M, Samuel P, Webb S, Jiang F, Eudes F (2020). Genome editing in wheat microspores and haploid embryos mediated by delivery of ZFN proteins and cell-penetrating peptide complexes. *Plant Biotechnol. J.* 18(5): 1307-1316. doi: 10.1111/pbi.13296. Epub 2019 Dec 3. PMID: 31729822; PMCID: PMC7152605.

Brinkman EK, Chen T, de Haas M, Holland HA, Akhtar W, van Steensel B (2018). Kinetics and fidelity of the repair of Cas9-induced double-strand DNA breaks. *Mol. Cell* 70: 801-813.e806. doi: 10.1016/j.molcel.2018.04.016

Cai Y, Chen L, Liu X, Guo C, Sun S, Wu C, Jiang B, Han T, Hou W (2018). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmFT2a delays flowering time in soya bean. *Plant Biotechnol. J.* 16(1): 176-185. doi: 10.1111/pbi.12758

Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, Zhang L, Meng X, Gregory PD, Schwinzer R, Cost GJ, Niemann H (2011). Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108(29):

12013-12017. doi: 10.1073/pnas.1106422108. Epub 2011 Jul 5.

Jansing J, Schiermeyer A, Schillberg S, Fischer R, Bortesi L (2019). Genome Editing in Agriculture: Technical and Practical Considerations. *Int. J. Mol. Sci.* 20(12): 2888. doi: 10.3390/ijms20122888. PMID: 31200517; PMCID: PMC6627516.

Kawall K (2019). New Possibilities on the Horizon: Genome Editing Makes the Whole Genome Accessible for Changes. *Front. Plant Sci.* 10: 525. doi: 10.3389/fpls.2019.00525. PMID: 31068963; PMCID: PMC6491833.

Kim S-R, Lee J, Jun S-H, Park S, Kang H-G, Kwon S, An G (2003). Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants. *Plant Mol. Biol.* 52: 761-773. doi: 10.1023/a:1025093101021

Kosicki M, Tomberg K, Bradley A (2018). Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat. Biotechnol.* 36: 765-771.

Kyrou K, Hammond AM, Galizi R, Kranjc N, Burt A, Beaghton AK, Nolan T, Crisanti A (2018). A CRISPR-Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Nat. Biotechnol.* 36(11): 1062-1066. doi: 10.1038/nbt.4245

Latham JR, Wilson AK, Steinbrecher RA (2006). The mutational consequences of plant transformation. *J. Biomed. Biotechnol.* 25376. doi: 10.1155/JBB/2006/25376

Li R, Li R, Li X, Fu D, Zhu B, Tian H, Luo Y, Zhu H (2018). Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ -aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. *Plant Biotechnol. J.* 16(2): 415-427. doi: 10.1111/pbi.12781. Epub 2017 Aug 2. PMID: 28640983; PMCID: PMC5787826.

Li Z, Liu ZB, Xing A, Moon BP, Koellhoffer JP, Huang L, Ward RT, Clifton E, Falco SC, Cigan AM (2015). Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol.* 169(2): 960-970. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00783>

- Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, Zhao Q, Liu J, Zhang H, Liu C, Ran Y, Gao C (2017). Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* 8: 14261.
- Luo S, Li J, Stoddard TJ, Baltes NJ, Demorest ZL, Clasen BM, Coffman A, Retterath A, Mathis L, Voytas DF, Zhang F (2015). Non-transgenic Plant Genome Editing Using Purified Sequence-Specific Nucleases. *Mol. Plant* 8(9): 1425-1427. doi: 10.1016/j.molp.2015.05.012
- Mackenzie R, Burhenne-Guilmin F, La Viña AGM, Werksman JD in cooperation with Ascencio A, Kinderlerer J, Kumme K, Tapper R (2003). *An Explanatory Guide to the Cartagena Protocol on Biosafety*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. xvi + 295pp.
- Makarevitch I, Svitashv SK, Somers DA (2003). Complete sequence analysis of transgene loci from plants transformed via microprojectile bombardment. *Plant Mol. Biol.* 52: 421-432. doi: 10.1023/a:1023968920830
- Metje-Sprink J, Menz J, Modrzejewski D, Sprink T (2019). DNA-Free Genome Editing: Past, Present and Future. *Front Plant Sci.* 14(9): 1957. doi: 10.3389/fpls.2018.01957. PMID: 30693009; PMCID: PMC6339908.
- Mou H, Smith JL, Peng L, Yin H, Moore J, Zhang XO, Song CQ, Sheel A, Wu Q, Ozata DM, Li Y, Anderson DG, Emerson CP, Sontheimer EJ, Moore MJ, Weng Z, Xue W (2017). CRISPR/Cas9-mediated genome editing induces exon skipping by alternative splicing or exon deletion. *Genome Biol.* 18(1): 108.
- Norris AL, Lee SS, Greenlees KJ, Tadesse DA, Miller MF, Lombardi HA (2020). Template plasmid integration in germline genome-edited cattle. *Nat. Biotechnol.* 38(2): 163-164. doi: 10.1038/s41587-019-0394-6
- Ono R, Yashuhiko Y, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y (2019). Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Communications Biology* 2: 57.
- Qi W, Zhu T, Tian Z, Li C, Zhang W, Song R (2016). High-efficiency CRISPR/Cas9 multiplex gene editing using the glycine tRNA-processing system-based strategy in maize. *BMC Biotechnol.* Aug 11; 16(1): 58. doi: 10.1186/s12896-016-0289-2. PMID: 27515683; PMCID: PMC4982333.
- Ran Y, Patron N, Kay P, Wong D, Buchanan M, Cao YY, Sawbridge T, Davies JP, Mason J, Webb SR, Spangenberg G, Ainley WM, Walsh TA, Hayden MJ (2018). Zinc finger nuclease-mediated precision genome editing of an endogenous gene in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) using a DNA repair template. *Plant Biotechnol. J.* 16(12): 2088-2101.
- Rang A, Linke B, Jansen B (2005). Detection of RNA variants transcribed from the transgene in Roundup Ready soybean. *Eur. Food Res. Technol.* 220: 438-443. doi:10.1007/s00217-004-1064-5
- Roldan MVG, Périlleux C, Morin H, Huerga-Fernandez S, Latrasse D, Benhamed M, Bendahmane A (2017). Natural and induced loss of function mutations in SIMBP21 MADS-box gene led to jointless-2 phenotype in tomato. *Sci. Rep.* 7(1): 4402. doi: 10.1038/s41598-017-04556-1
- Shin HY, Wang C, Lee HK, Yoo KH, Zeng X, Kuhns T, Yang CM, Mohr T, Liu C, Hennighausen L (2017). CRISPR/Cas9 targeting events cause complex deletions and insertions at 17 sites in the mouse genome. *Nat. Commun.* 8: 15464.
- Skryabin BV, Kummerfeld DM, Gubar L, Seeger B, Kaiser H, Stegemann A, Roth J et al. (2020). Pervasive head-to-tail insertions of DNA templates mask desired CRISPR-Cas9-mediated genome editing events. *Sci. Adv.* 6(7): eaax2941.
- Soyk S, Lemmon ZH, Oved M, Fisher J, Libertore KL, Park SJ, Goren A, Jiang K, Ramos A, van der Knaap E, Van Eck J, Zamir D, Eshed Y, Lippman ZB (2017). Bypassing Negative Epistasis on Yield in Tomato Imposed by a Domestication Gene. *Cell* 169(6): 1142-1155. e12. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.032

- Stoddard TJ, Clasen BM, Baltes NJ, Demorest ZL, Voytas DF, Zhang F et al. (2016). Targeted mutagenesis in plant cells through transformation of sequence-specific nuclease mRNA. *PLoS One* 11: e0154634. doi: 10.1371/journal.pone.0154634
- Suzuki KT, Isoyama Y, Kashiwagi K, Sakuma T, Ochiai H, Sakamoto N, Furuno N, Kashiwagi A, Yamamoto T (2013). High efficiency TALENs enable F0 functional analysis by targeted gene disruption in *Xenopus laevis* embryos. *Biol. Open*. 2(5): 448-452. doi: 10.1242/bio.20133855. PMID: 23789092; PMCID: PMC3654262.
- Taagen E, Bogdanove AJ, Sorrells ME (2020). Counting on Crossovers: Controlled Recombination for Plant Breeding. *Trends Plant Sci.* 25(5): 455-465. doi: 10.1016/j.tplants.2019.12.017
- Tuladhar R, Yeu Y, Tyler Piazza J, Tan Z, Clemenceau JR, Wu X, Barrett Q, Herbert J, Mathews DH, Kim J, Hwang TH, Lum L (2019). CRISPR-Cas9-based mutagenesis frequently provokes on-target mRNA misregulation. *Nat. Commun.* 10: 4056. doi: 10.1038/s41467-019-12028-5
- Wang W, Pan Q, He F, Akhunova A, Chao S, Trick H, Akhunov E (2018). Transgenerational CRISPR-Cas9 Activity Facilitates Multiplex Gene Editing in Allopolyploid Wheat. *CRISPR J.* 1(1): 65-74. doi: 10.1089/crispr.2017.0010. PMID: 30627700; PMCID: PMC6319321.
- Windels P, De Buck S, Van Bockstaele E, De Loose M, Depicker A (2003). T-DNA integration in Arabidopsis chromosomes. Presence and origin of filler DNA sequences. *Plant Physiol.* 133: 2061-2068. doi: 10.1104/pp.103.027532
- Wolt JD, Wang K, Sashital D, Lawrence-Dill CJ (2016). Achieving Plant CRISPR Targeting that Limits Off-Target Effects. *Plant Genome* 9(3). doi: 10.3835/plantgenome2016.05.0047
- Zhu C, Bortesi L, Baysal C, Twyman RM, Fischer R, Capell T, Schillberg S, Christou P (2017). Characteristics of Genome Editing Mutations in Cereal Crops. *Trends Plant Sci.* 22(1): 38-52. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.009