



INSTITUT

Amélioration génétique et adaptation des
plantes méditerranéennes et tropicales

Présentation du plateau



Présentation du plateau AFEG - Analyse Fonctionnelle et Édition des Génomes



Unité AGAP :

+ de 300 salarié.e.s regroupé.e.s en **13 équipes de recherche**
10 plateaux techniques
3 centres de ressources biologiques

Plateau AFEG :

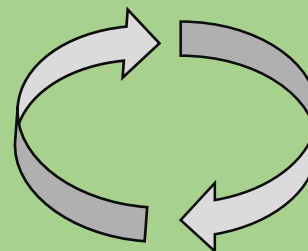
Offre aux scientifiques végétalistes l'environnement et les outils pour conduire des études permettant d'élucider la fonction des gènes (spé: espèces méditerranéennes et tropicales)

En résumé :

- Plateau de biologie moléculaire classique / Expertise Edition du Génome
<https://umr-agap.cirad.fr/l-unite/notre-expertise-scientifique-et-technique/plateaux2/plateau-analyse-fonctionnelle-et-edition-des-genomes>
- Liens fonctionnels étroits plateau InCell (Ingénierie Cellulaire)

- Clonage de vecteurs
- Bactériologie

- Caractérisation moléculaire des plantes produites



Plateau InCell :

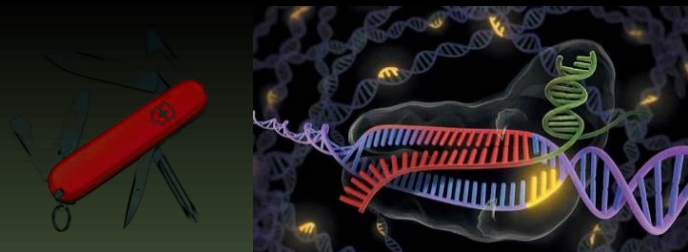
- Transformation génétique de plante
- Culture In Vitro

Resp. Aurore Vernet



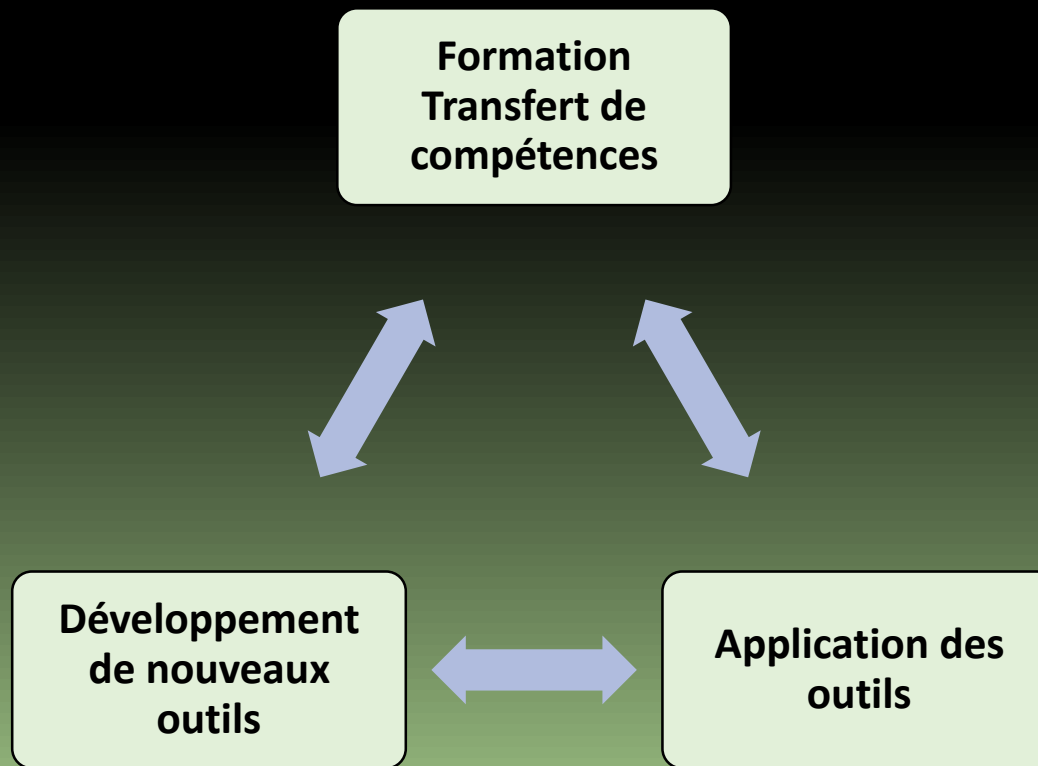
Présentation du plateau AFEG

Septembre 2017 : Création du plateau



➤ Missions scientifique du personnel* :

*expertise Édition des Génomes



(+ gestion opérationnelle et appui administratif et budgétaire plateau)

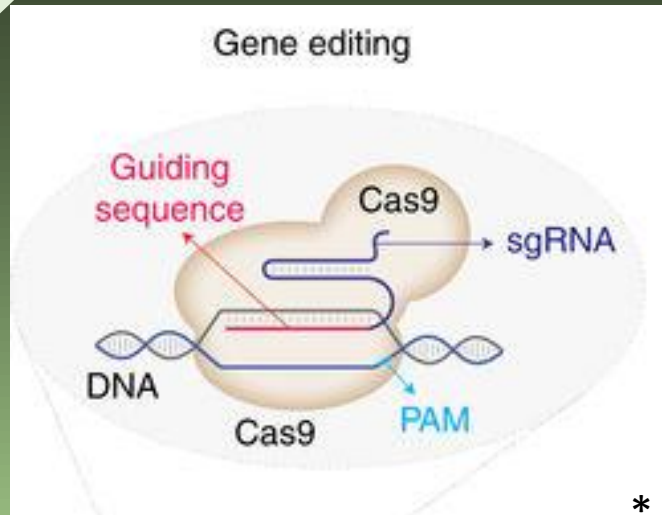
Les projets :

ANALYSE FONCTIONNELLE DE GENES

- Etude des gènes impliqués dans la recombinaison méiotique (Diversité génétique)
- Etude de gènes impliqués dans le développement et l'adaptation/la réponse aux stress abiotiques (environnementaux)
- Etude de gènes impliqués dans la réponse aux stress biotiques (pathogène)

DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE

Les outils dont nous disposons sur le plateau



CRISPR/Cas9

** Modified from Mazhar Adli, 2018*

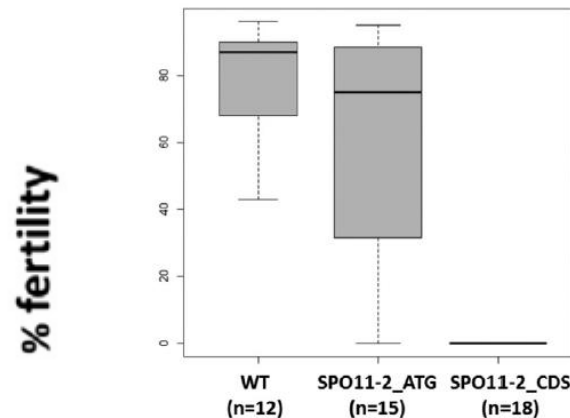
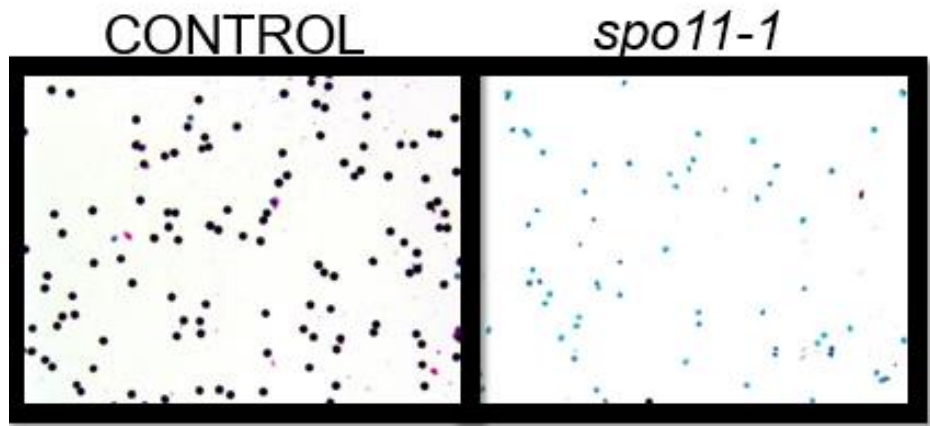
*** Modified from Zaidi et al, 2017*

Assessment of the roles of SPO11-2 and SPO11-4 in meiosis in rice using CRISPR/Cas9 mutagenesis

Table 1. Summary of sequence analysis at sites targeted by CRISPR/Cas9 mutagenesis in primary transformants

sgRNA	Number of edited plants	Number of unedited plants	Mutation frequency	Edited plants with a single nucleotide change	Single nucleotide change frequency
SPO11-1_ATG	9	3	75%	7	78%
SPO11-1_CDS	3	0	100%	0	0%
SPO11-2_ATG	15	4	79%	7	47%
SPO11-2_CDS	18	2	90%	10	56%
SPO11-4_ATG	28	5	85%	12	43%
SPO11-4_CDS	7	6	54%	2	29%
Total	80	20	80%	38	48%

Viabilité pollinique



Fayos et al, 2020



Les projets :

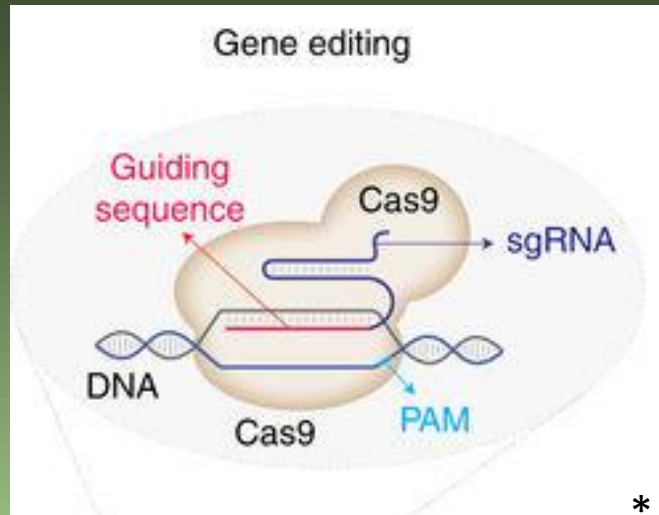
ANALYSE FONCTIONNELLE DE GENES

- Etude des gènes impliqués dans la recombinaison méiotique (Diversité génétique)
- Etude de gènes impliqués dans le développement et l'adaptation/la réponse aux stress abiotiques (environnementaux)
- Etude de gènes impliqués dans la réponse aux stress biotiques (pathogène)

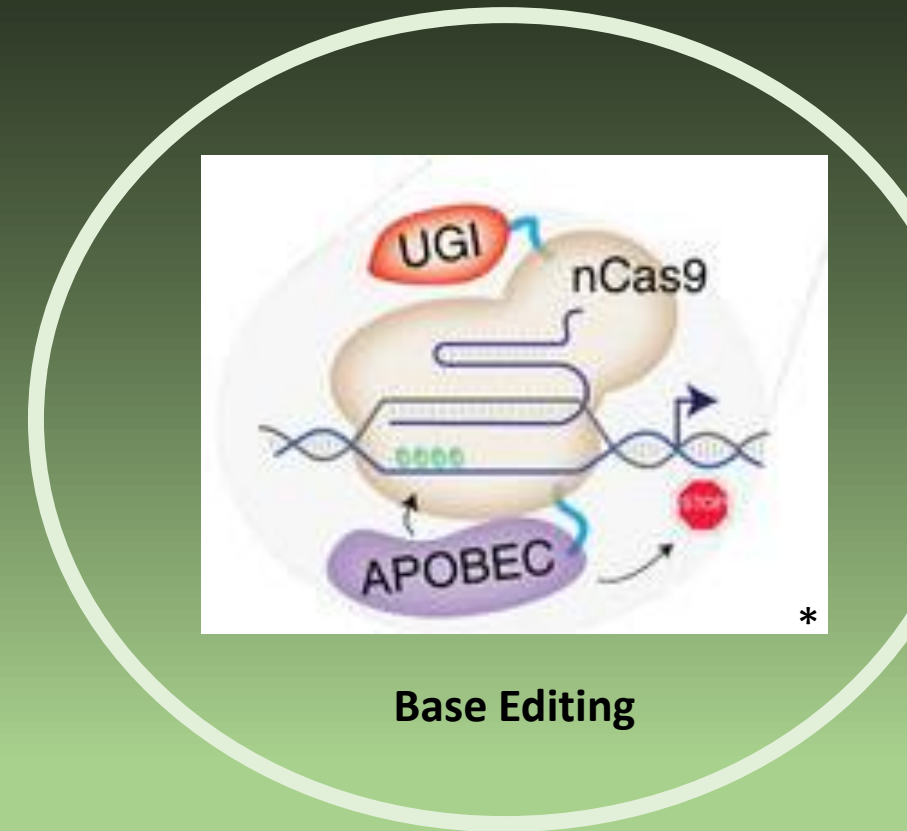
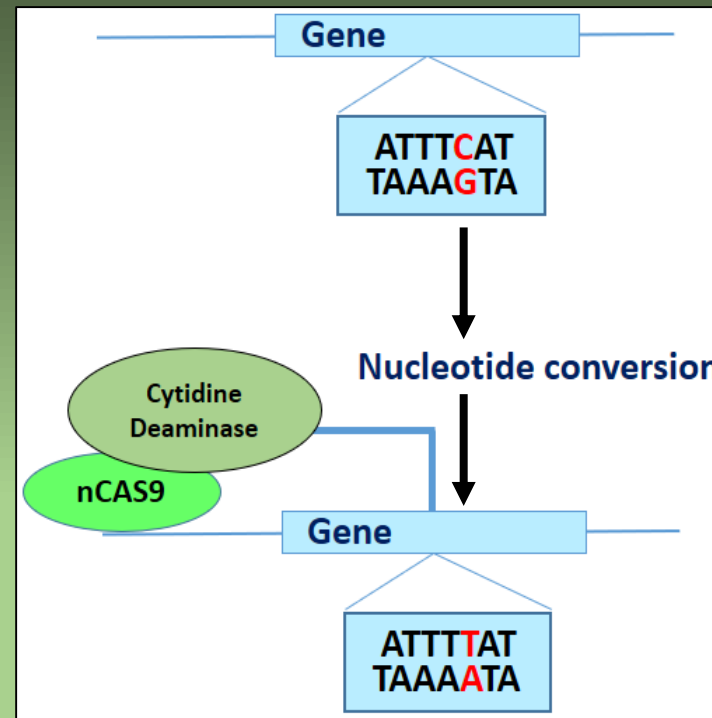
DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE

Présentation du plateau AFEG

Les outils dont nous disposons sur le plateau



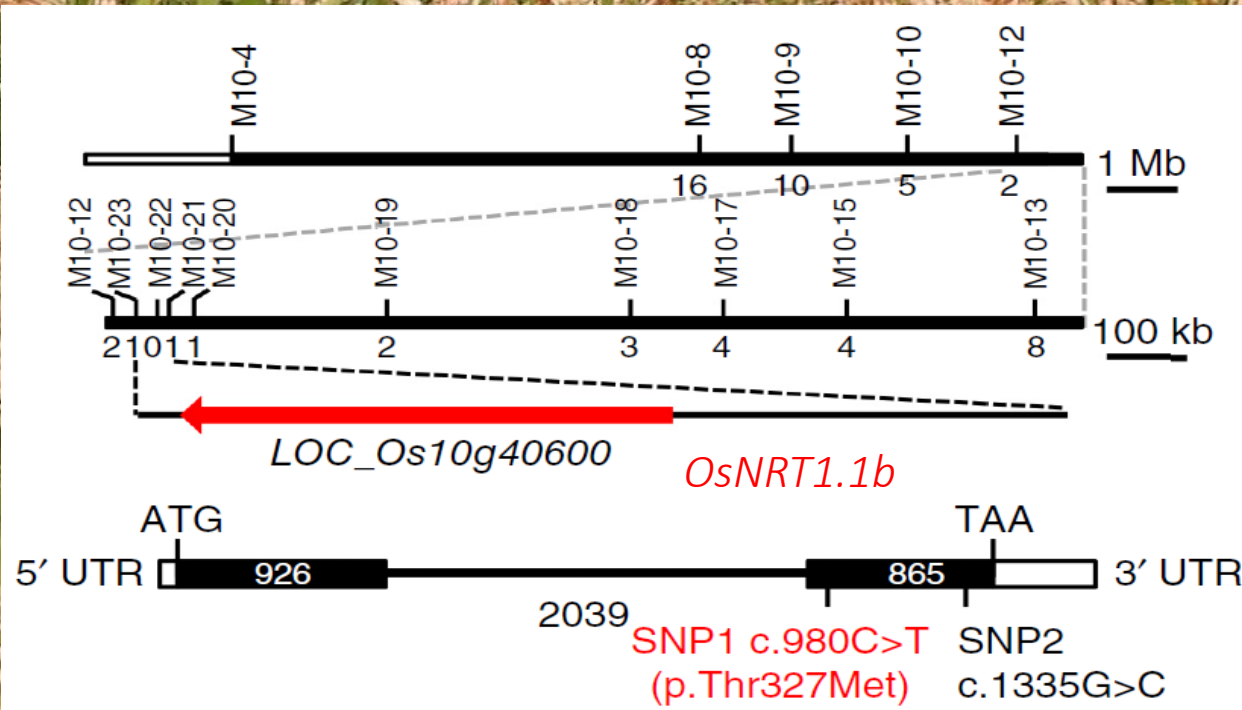
CRISPR/Cas9



Base Editing

* Modified from Mazhar Adli, 2018

** Modified from Zaidi et al, 2017

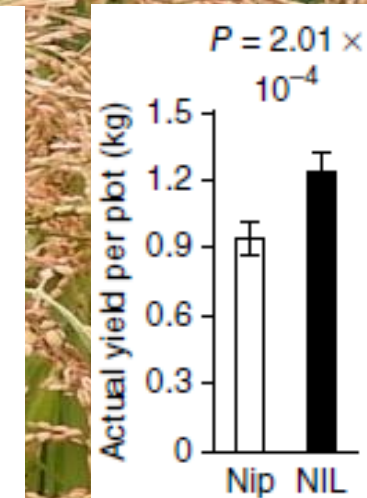
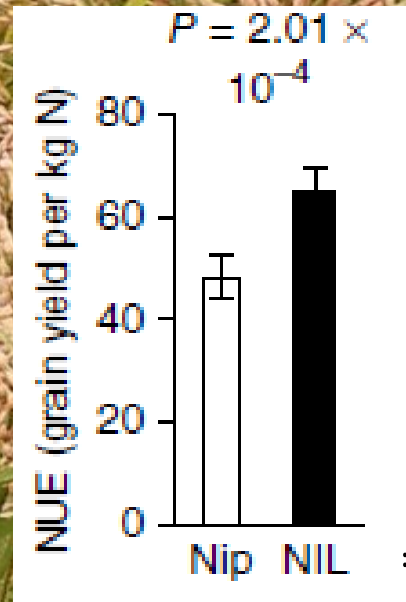


Hu et al., 2015

Oryza sativa (riz)

2 sous espèces: *indica* et *japonica*

Indica meilleure NUE que *japonica*



= Nip + *NRT1.1b-indica*

japonica

Thèse Léo Herbert

Thèse Léo Herbert (Projet Agropolis Fondation « GeneRice » 2017-2019):

Ciblage précis avec Base Editor de la cytosine responsable de la moins bonne NUE chez un fond japonica CULTIVE à Madagascar : Chhomrong Dam

Puis phénotypage au champ (Colombie CIAT) en condition de forte et faible concentration d'azote

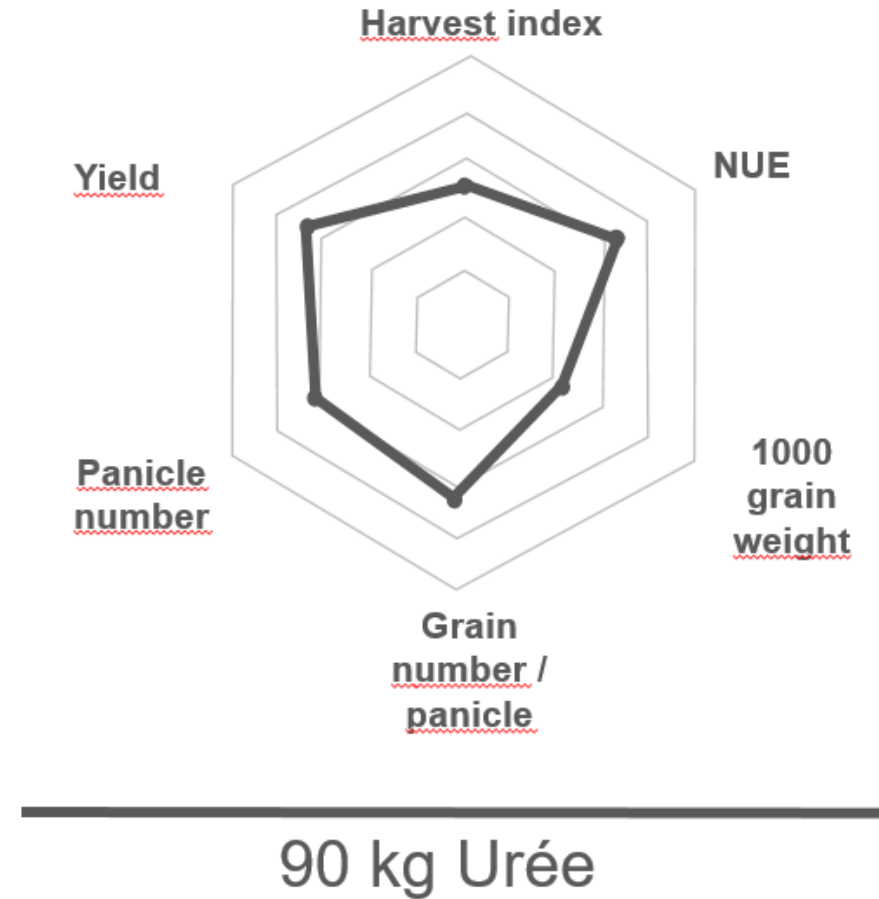
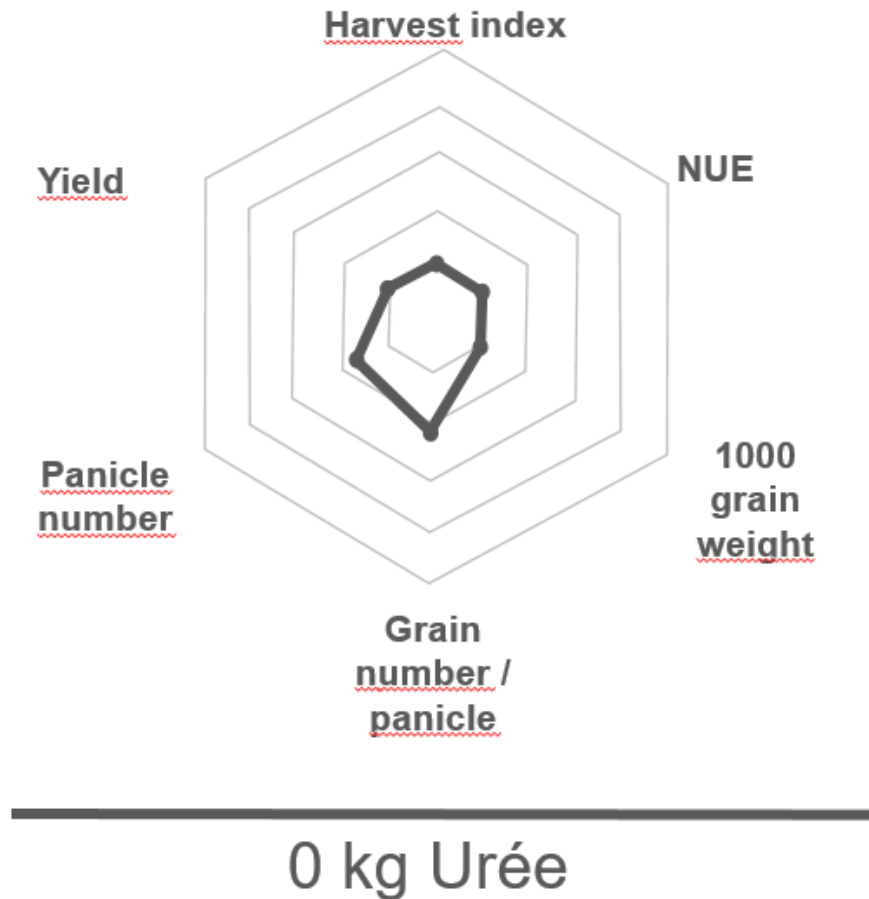
Mesure de divers paramètres agronomiques



Photo : CIAT

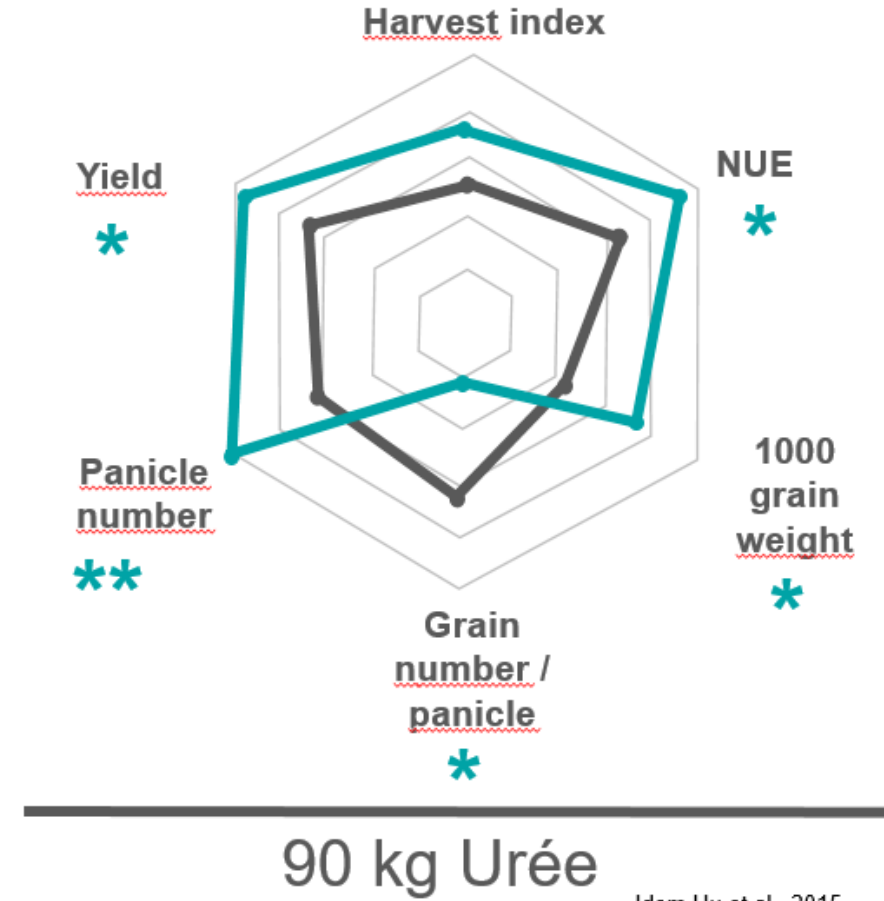
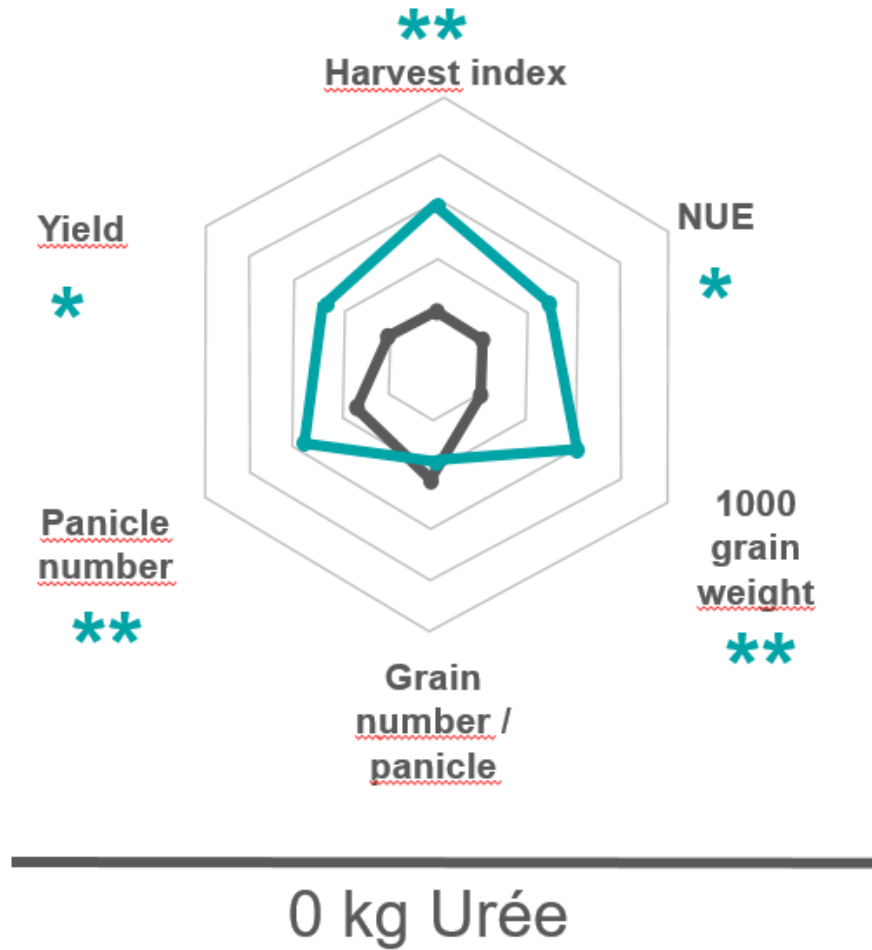
RADAR of WT NRT1.1b-C

Thèse Léo Herbert



RADAR of WT NRT1.1b-T (indica allele)

Thèse Léo Herbert

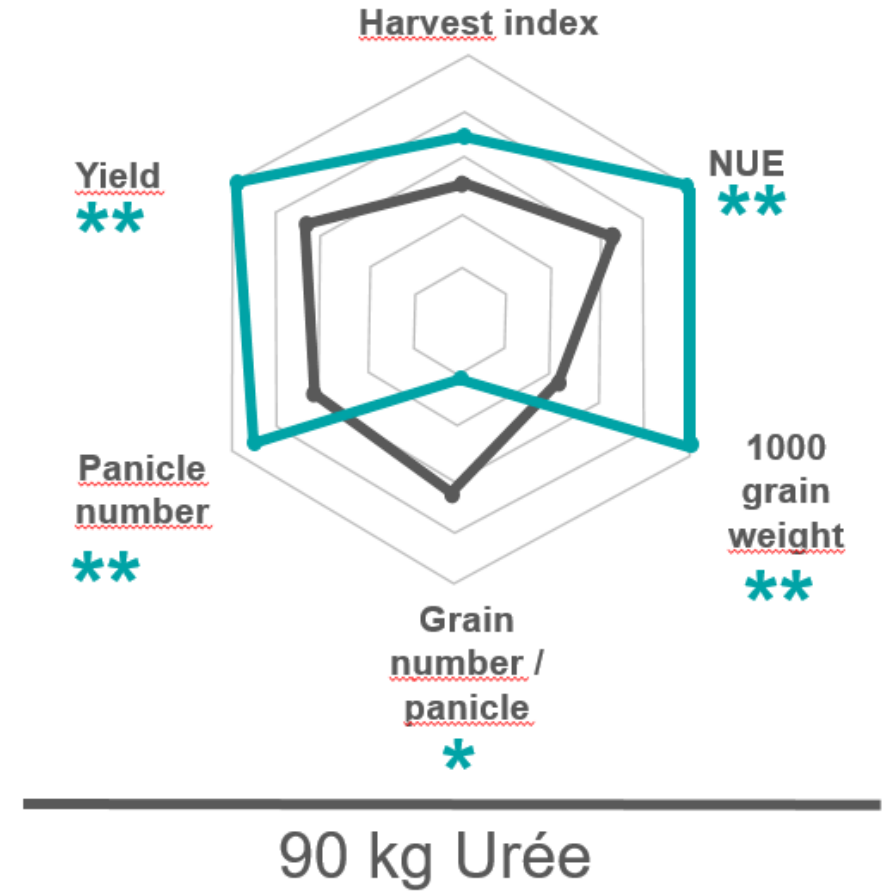
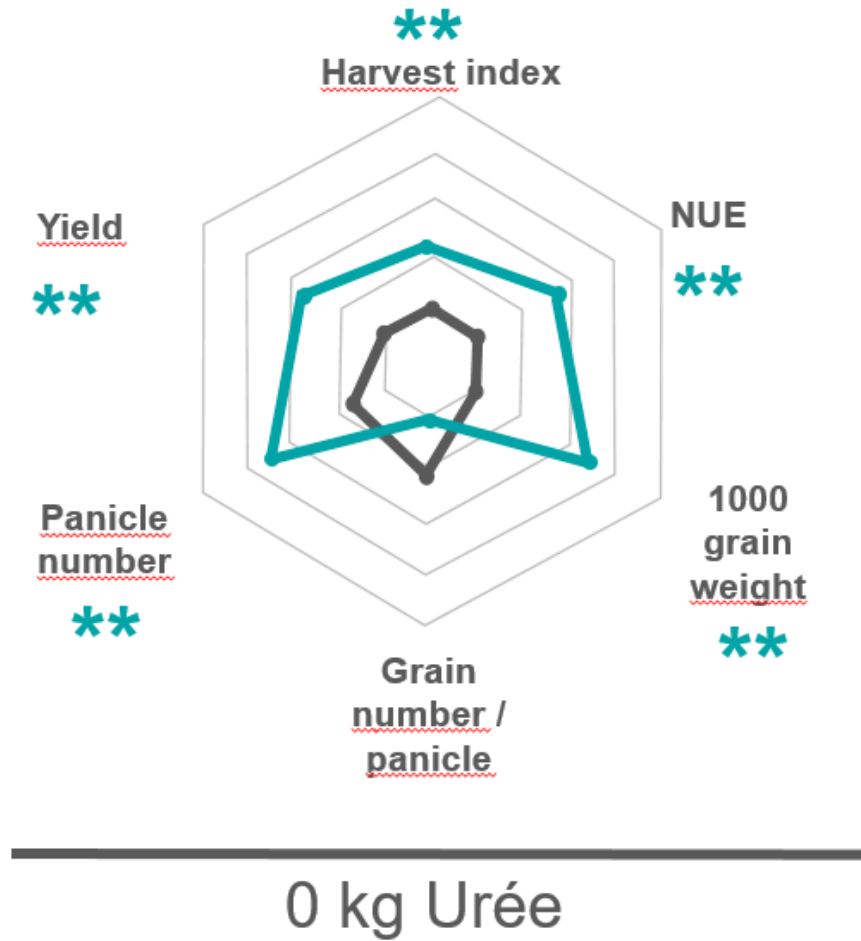


Idem Hu et al., 2015

91

RADAR of WT NRT1.1b-G (« undesired » allele)

Thèse Léo Herbert



Les projets :

ANALYSE FONCTIONNELLE DE GENES

- Etude des gènes impliqués dans la recombinaison méiotique (Diversité génétique)
- Etude de gènes impliqués dans le développement et l'adaptation/la réponse aux stress abiotiques (environnementaux)
- Etude de gènes impliqués dans la réponse aux stress biotiques (pathogène)

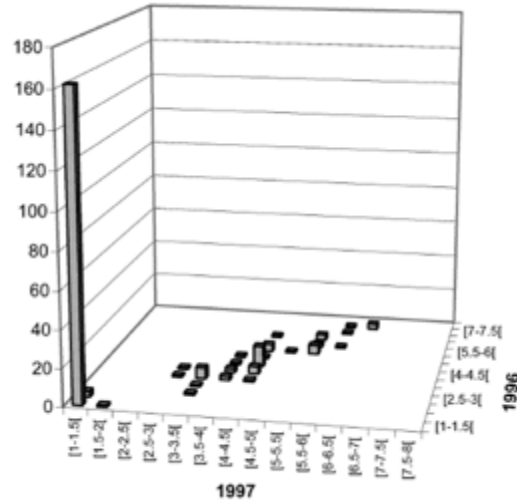
DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE

PROJET Analyse Fonctionnelle / Réponse aux stress biotiques

- cultivar R570 bears a major gene (*Bru1*) that provides resistance to brown rust (1996)
- *Bru1* confers durable resistance to brown rust and explains resistance in many cultivars worldwide



Brown rust
Puccinia melanocephala



→ a major resistance gene

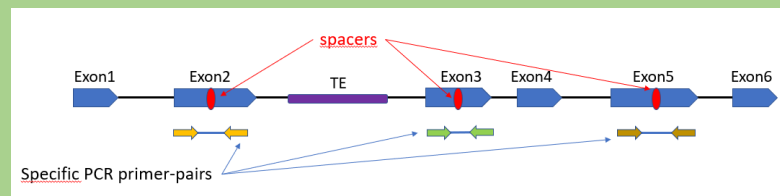
Daugrois et al, 1996, TAG;
Grivet et al, 1996, Genetic.
Asnaghi et al 2004, TAG

700 progeny of R570 (selfed) evaluated:

Canne à sucre:
QTL de résistance à la rouille
Gène encore indéterminé



Projet CHACRA (Argentine) / CIRAD (Eq. Structure et Evolution des Génome / PLATEAU AFEG)



Validation de gènes candidats de résistance à la rouille de la canne à sucre par mutagénèse CRISPR/Cas

Les projets :

ANALYSE FONCTIONNELLE DE GENES

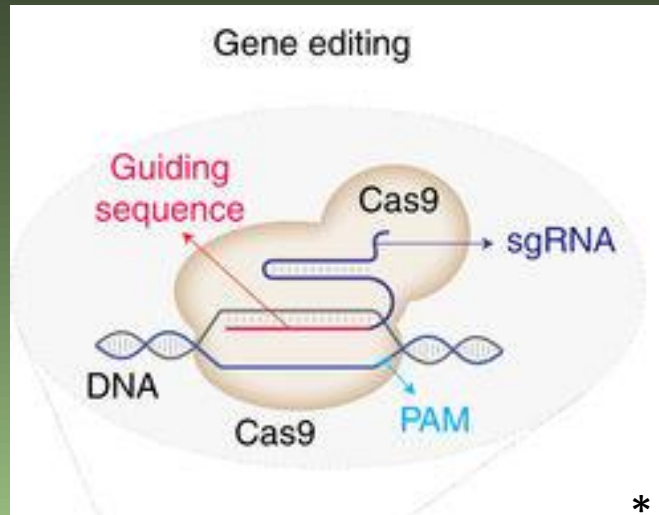
- Etude des gènes impliqués dans la recombinaison méiotique (Diversité génétique)
- Etude de gènes impliqués dans le développement et l'adaptation/la réponse aux stress abiotiques (environnementaux)
- Etude de gènes impliqués dans la réponse aux stress biotiques (pathogène)

DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE

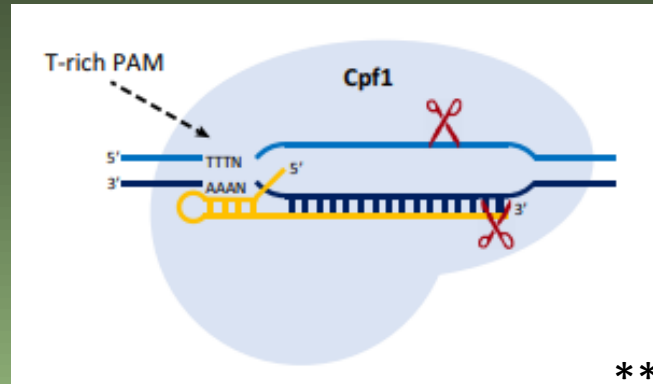


Présentation du plateau AFEG

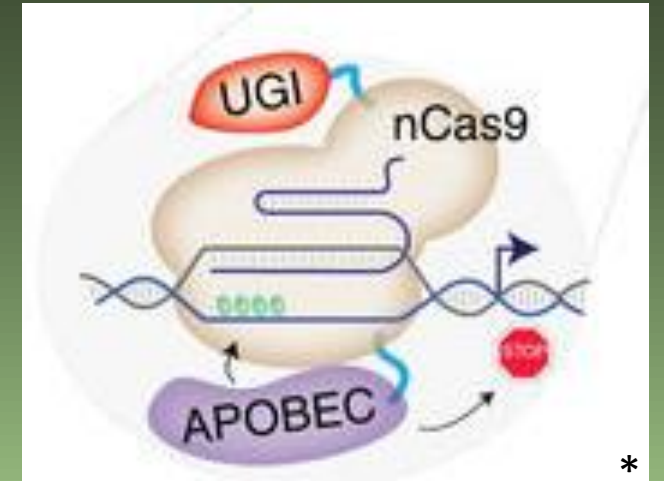
Les outils dont nous disposons sur le plateau



CRISPR/Cas9



CRISPR/Cpf1

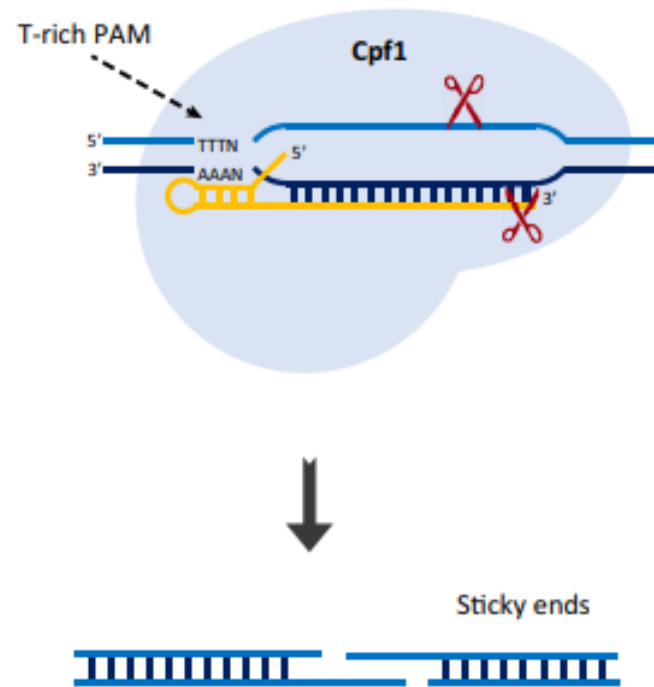


Base Editing

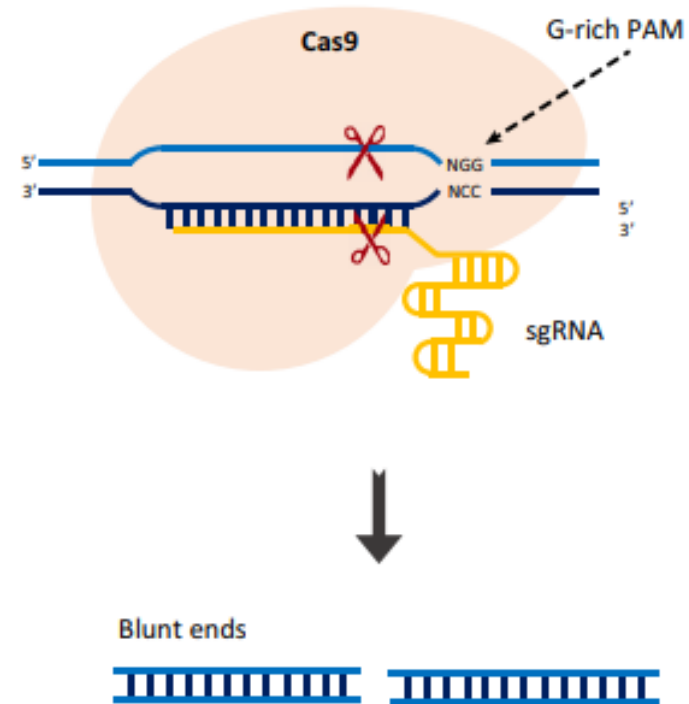
* Modified from Mazhar Adli, 2018

** Modified from Zaidi et al, 2017

(A) CRISPR-Cpf1

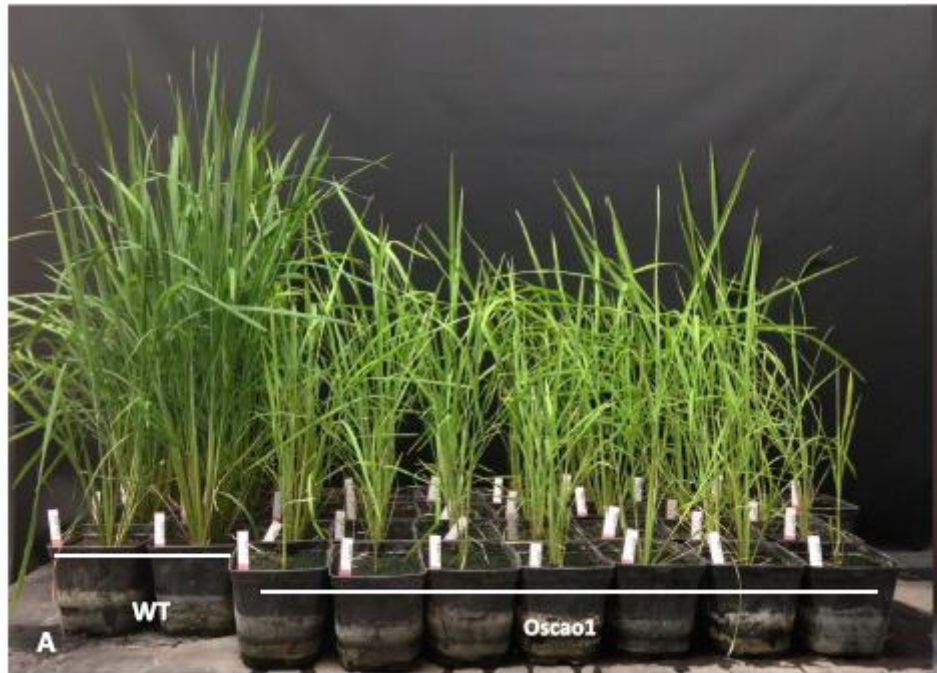
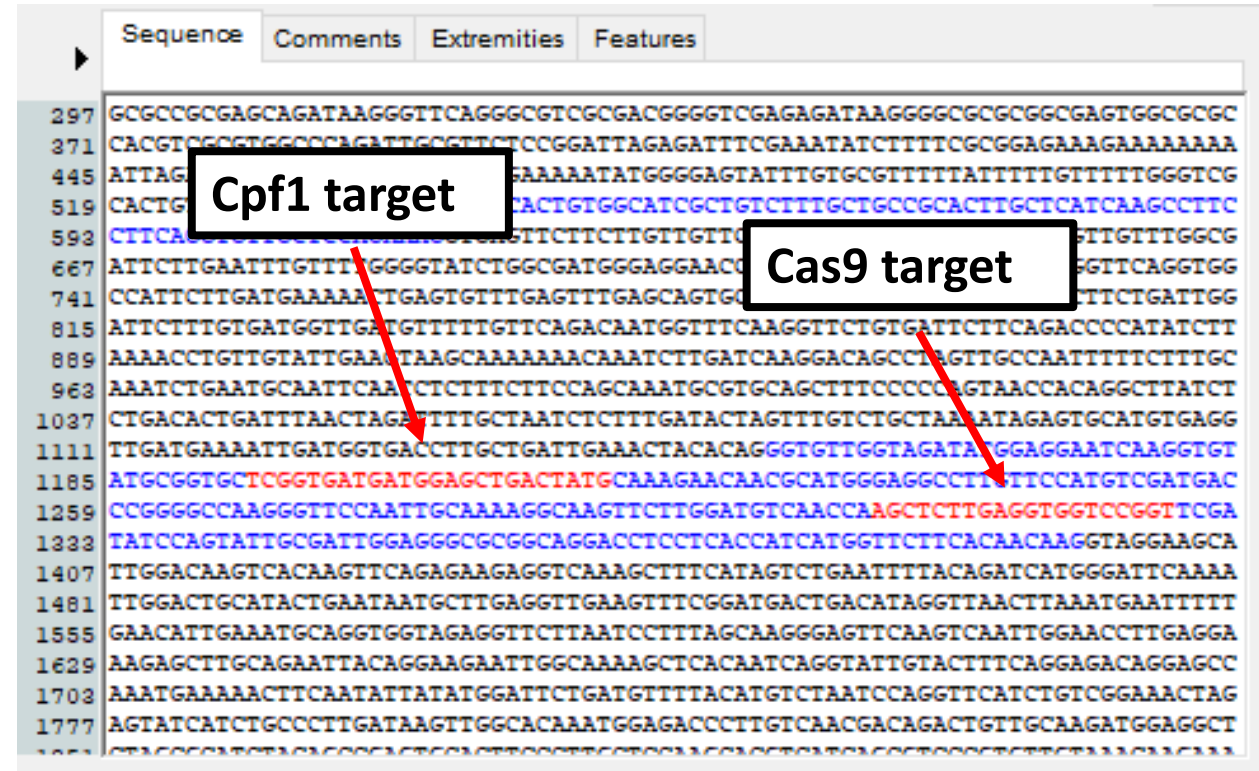
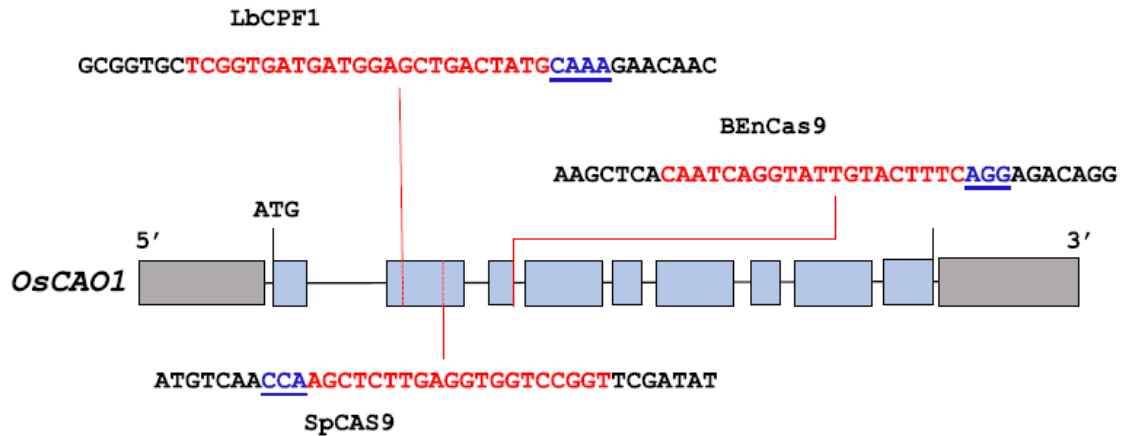


(B) CRISPR-Cas9



Trends in Plant Science, 2017, Vol. 22, No. 7

CRISPR/Cpf1 vs CRISPR/Cas9



Herbert et al, 2020

Comparaison des types de mutations

CRISPR/Cpf1 vs CRISPR/Cas9

Obtenu avec CAS9

```

ATATCGAACCGGACCACCTCAAGAGCTTGGTTGACATCCAAGAA WT [x4]
ATATCGAACCGGACCACCTCAAGnAGCTTGGTTGACATCCAAGAA +1 [x28] (16A, 5G, 4T, 3C)
ATATCGAACCGGACCACCTCAAG--CTTGGTTGACATCCAAGAA -2 [x4]
ATATCGAACCGGACCACCTCA--GAGCTTGGTTGACATCCAAGAA -1 [x3]
ATATCGAACCGGACCACCTCAA---CTTGGTTGACATCCAAGAA -3 [x2] (homo)
ATATCGAACCGGACCACCTCAAGA-----A -19 [x2] (homo)
ATATCGAACCGGACCACCTCAAGAcgaac//ttatcGCTTGGTT +415 [x2] (homo)
ATATCGAACCGGACCACCTCAAGAcggettgggtgAcACATCCAAGAA +2 (-9,+11)
ATATCGAACCGGACCACCTCAAgcgagGCTTGGTTGACATCCAAGAA +2 (-3,+5)
ATATCGAACCGGACCACCTCAAagaAGCTTGGTTGACATCCAAGAA +2 (-1,+3)
ATATCGAACCGGACCACCTCAAGAGCTTGGcTTGACATCCAAGAA +1
ATATCGAACCGGACCACCTCAgagcGCTTGGTTGACATCCAAGAA +1 (-3,+4)
ATATCGAACCGGACCctccCAAGAGCTTGGTTGACATCCAAGAA +0 (-4+4)
ATATCGAACCGGACCACCTCAAGA-CTTGGTTGACATCCAAGAA -1
ATATCGAACCGGACCACCTCAAGAGCTTGGTT-ACATCCAAGAA -1
ATATCGAACCGGACCACCTCAAGAGa--GGTTGACATCCAAGAA -2 (-3+1)
ATATCGAACCGGACCACCTCAAGAG---GGTTGACATCCAAGAA -3
ATATCGAACCGGACCACCTCAgcca---GGTTGACATCCAAGAA -3 (-7,+4)
ATATCGAACCGGACCACCTCAAGAG---GGTTGACATCCAAGAA -3 (-10,+7)
ATATCGAACCGGACCACCTCAAGAG---GGTTGACATCCAAGAA -4 (-9,+5)
ATATCGAACCGGACCACCTCAAGAG---GGTTGACATCCAAGAA -15,+11)
ATATCGAACCGGACCACCTCAAGAG---GGTTGACATCCAAGAA -17,+8)
ATATCGAACCGGACCACCTCAAGAG---GGTTGACATCCAAGAA -32 (-35+3)
ATATCGAACCGGACCACCTCAAGAG---GGTTGACATCCAAGAA -76 (-77+1)
ATATCGAACCGGACCACCTCAAGAG---GGTTGACATCCAAGAA -251
    
```

Obtenu avec CPF1

```

GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCATCATCCCGAGCACCGCATACACCTTGA WT [x4]
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCATCA---CCGAGCACCGCATACACCTTGA -3 [x10] 2 homo
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTC-----GAGCACCGCATACACCTTGA -10 [x2] homo
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCAT-----GAGCACCGCATACACCTTGA -7 [x2]
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCATCA-----GCACCGCATACACCTTGA -7 [x2]
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCAT-----AGCACCGCATACACCTTGA -8 [x2]
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCAT----ACCGAGCACCGCATACACCTTGA -4
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCATCA----GAGCACCGCATACACCTTGA -5
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCATC----CGAGCACCGCATACACCTTGA -5
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCA-----GAGCACCGCATACACCTTGA -8
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCAT-----GCACCGCATACACCTTGA -9
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCA-----GCACCGCATACACCTTGA -10
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTC-----GCACCGCATACACCTTGA -12
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCC-----ACCGCATACACCTTGA -13
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCC-----CCGCATACACCTTGA -14
GTTGTTCTTTGCA-----CACCGAGCACCGCATACACCTTGA -16
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCA-----TACACCTTGA -18
GTTGTTCTTTGCA-----ATACACCTTGA -26
    
```



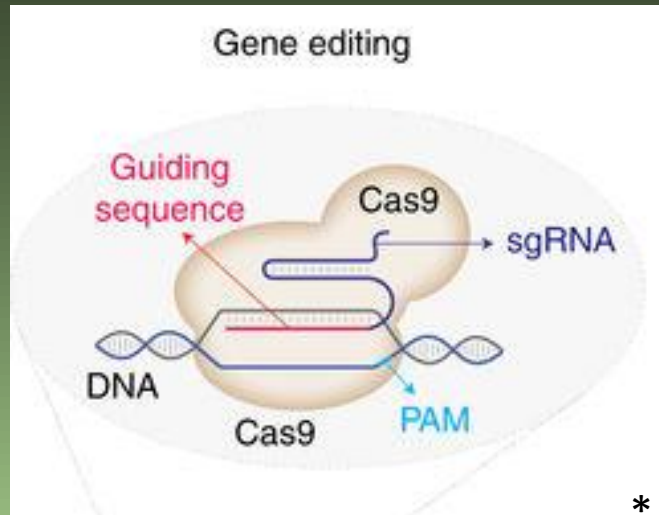
Herbert et al, 2020

Type de mutations obtenus différents entre les 2 nucléases

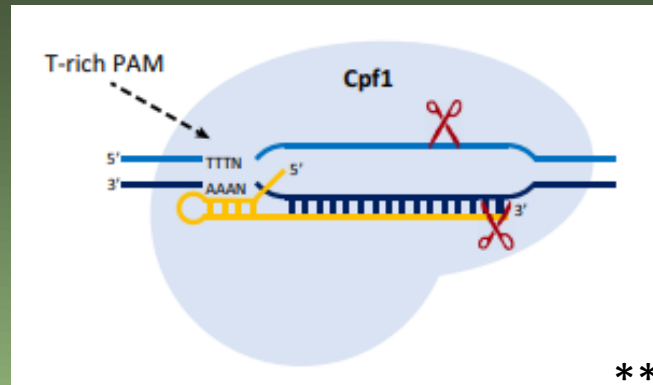
Intérêt CPF1: Délétion d'un domaine protéique / groupe acides aminés *sans décalage de phase*
Ciblage de régions régulatrices / promotrices... etc

Présentation du plateau AFEG

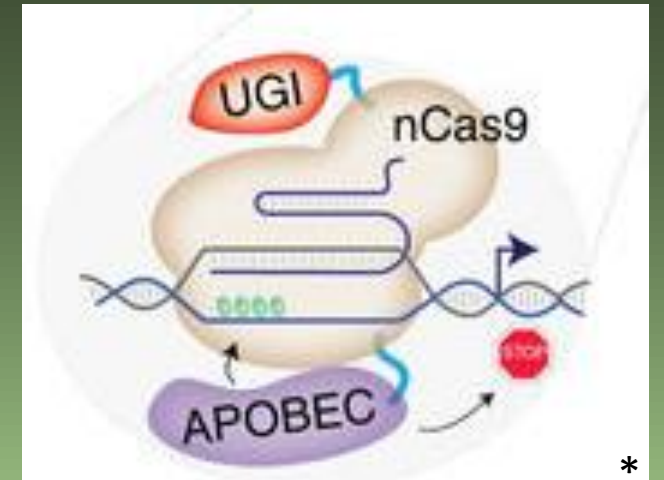
Les outils dont nous disposons sur le plateau



CRISPR/Cas9



CRISPR/Cpf1



Base Editing

Monocotylédone (espèce modèle *Oryza sativa* (Riz))

Dicotylédone (espèce modèle *Arabidopsis thaliana* / en cours d'implémentation - 2023)

Multiplexing

* Modified from Mazhar Adli, 2018

** Modified from Zaidi et al, 2017

Les projets :

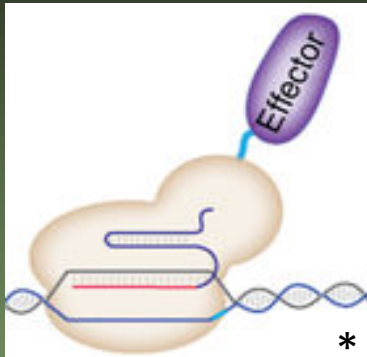
ANALYSE FONCTIONNELLE DE GENES

- Etude des gènes impliqués dans la recombinaison méiotique (Diversité génétique)
- Etude de gènes impliqués dans le développement et l'adaptation/la réponse aux stress abiotiques (environnementaux)
- Etude de gènes impliqués dans la réponse aux stress biotiques (pathogène)

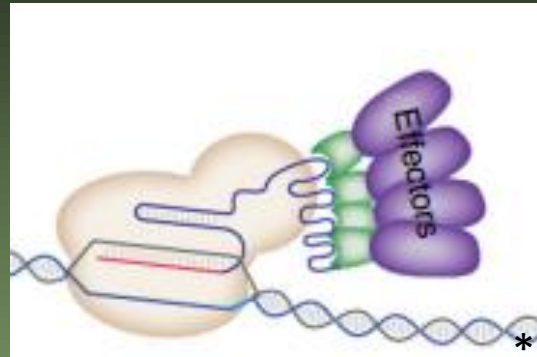
DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE

Présentation du plateau AFEG

Les outils **en cours de développement** sur le plateau



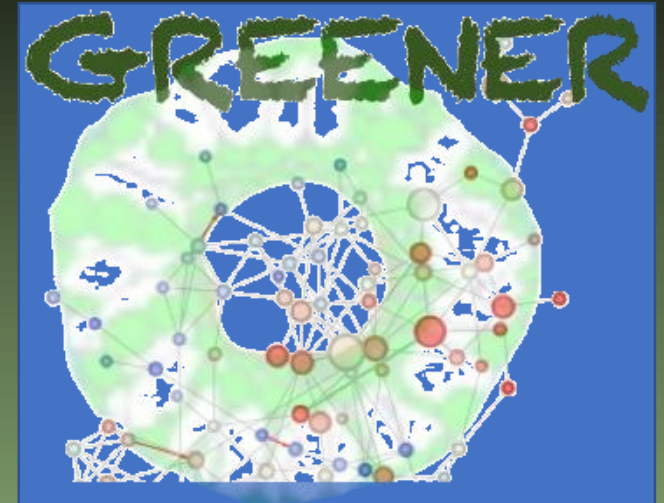
dCas9-fusion



Engineered sgRNA

Thèse de
Dylan Gallo /
Equipe DARS

** Modified from Mazhar Adli, 2018*



Des projets dans lesquels des outils/méthodos sont développées par des utilisateurs

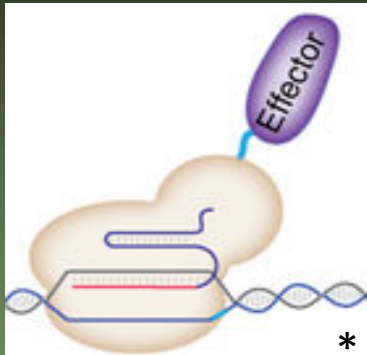
- Appui conseil expertise du plateau
- Suivi du développement



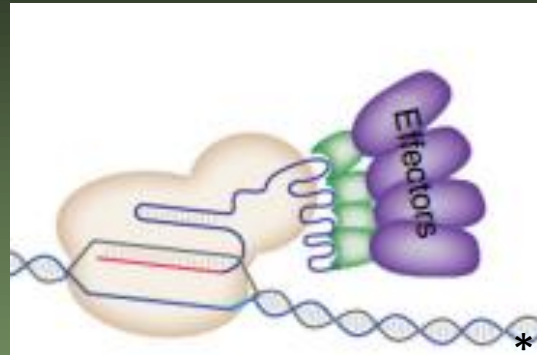
Seront ensuite ajoutés à la « banque d'outils » du plateau

Présentation du plateau AFEG

Les outils **en cours de développement** sur le plateau



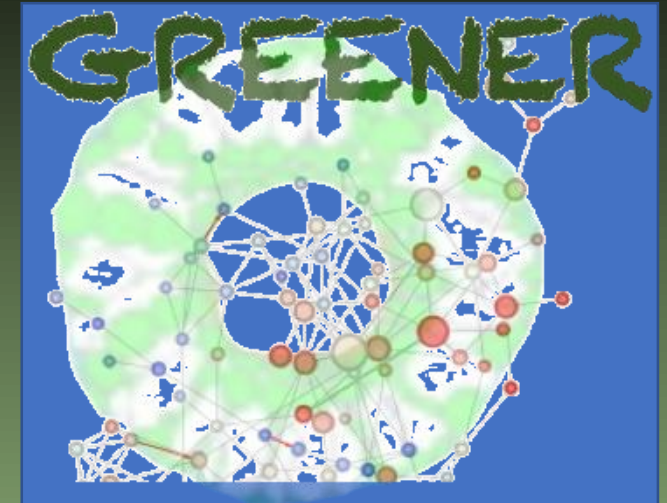
dCas9-fusion



Engineered sgRNA

Thèse de
Dylan Gallo /
Equipe DARS

** Modified from Mazhar Adli, 2018*



Des projets dans lesquels des outils/méthodos sont développées par des utilisateurs

- Appui conseil expertise du plateau
- Suivi du développement

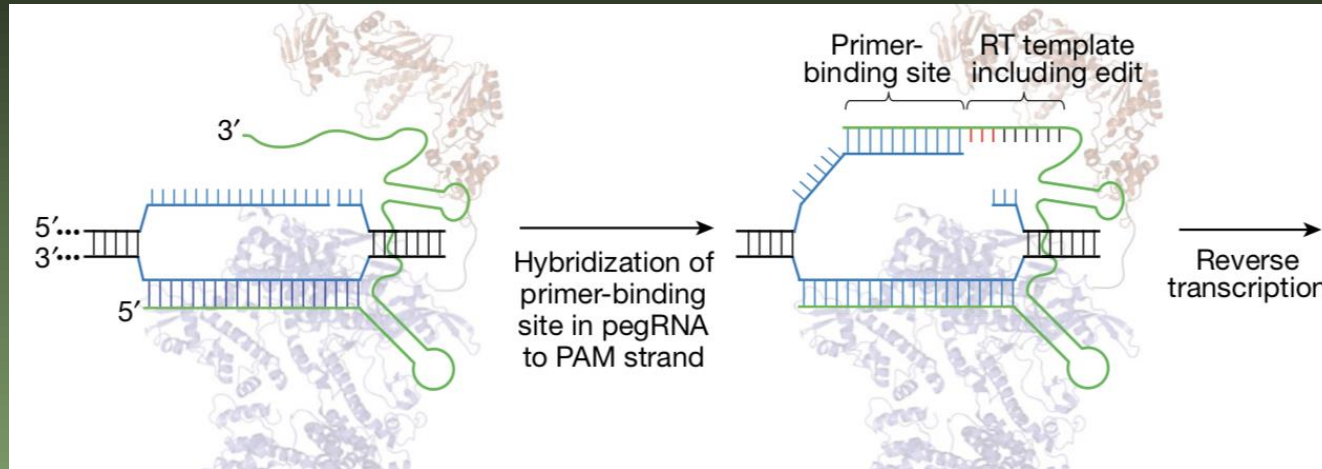
Des projets dans lesquels des outils/méthodos sont développées par les personnels plateaux (encore rares)

- Céline Georget / Anne Cécile Meunier (BM - civ)
- Aurore Vernet (CIV)

↓ ↓
Seront ensuite ajoutés à la « banque d'outils » du plateau

Présentation du plateau AFEG

Les outils **en cours de développement** sur le plateau



Optimisation du prime editing chez les plantes

**** Anzalone et al. 2019**

Des projets dans lesquels des outils/méthodos sont développées par les personnels plateaux (encore rares)

- Céline Georget / Anne Cécile Meunier (BM - civ)
- Aurore Vernet (CIV)



PEPR d'une Stratégie Nationale
Projet ciblé
2022

PEPR Sélection végétale avancée

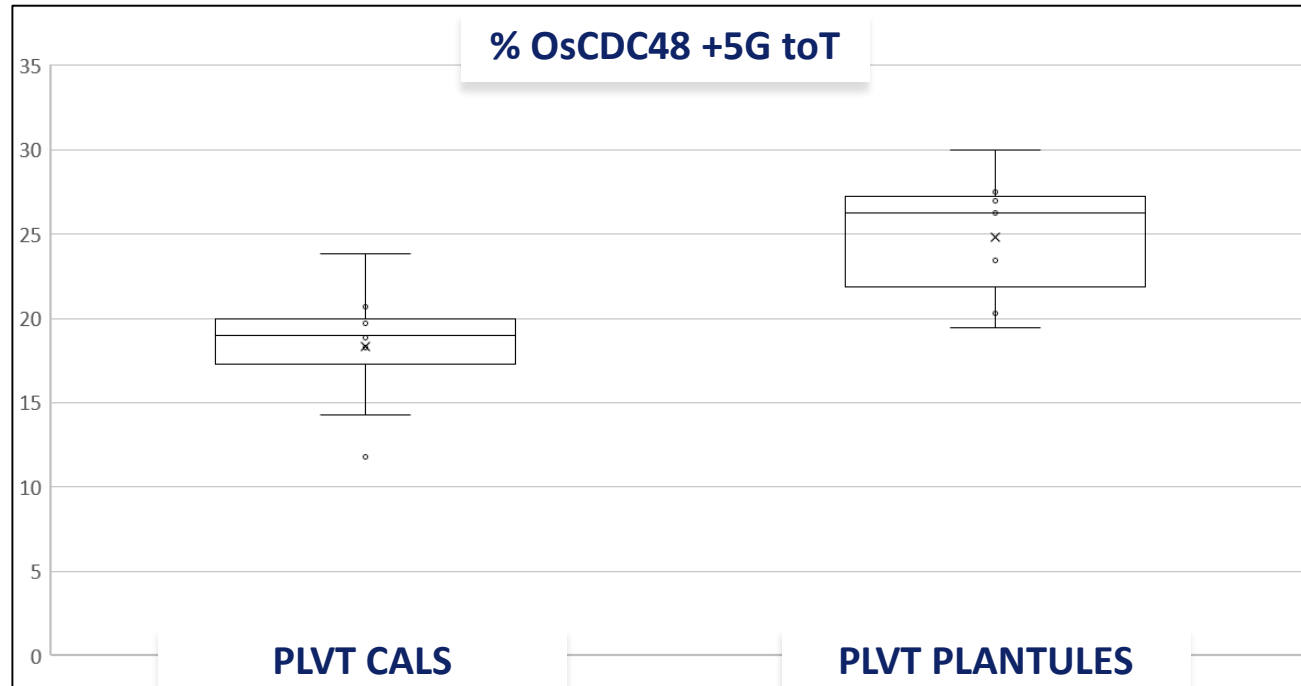
**TYPEX Project (2023-2028):
Toward highly Predictable Editing
of the plant genome leXicon.**

Seront ensuite ajoutés à la « banque d'outils » du plateau



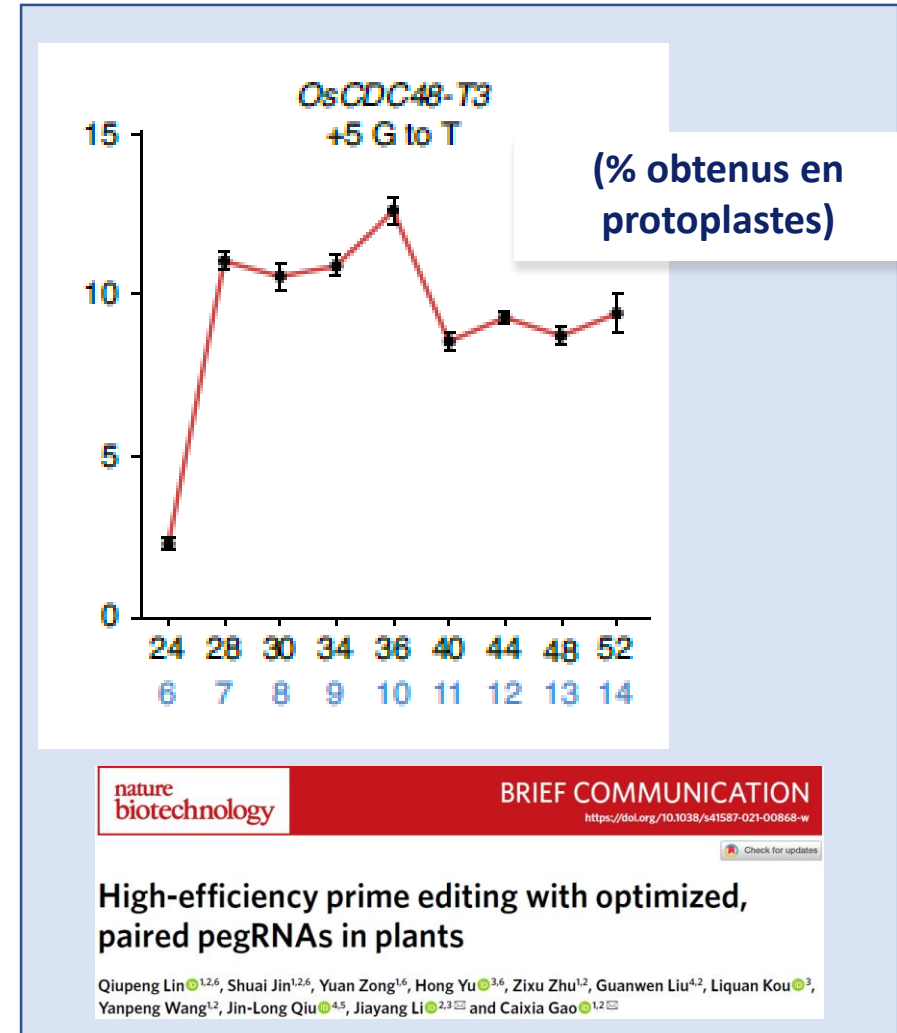
Premiers essais d'un Outil Prime Editing classique « Customisé » par le plateau AFEG/InCell.
Riz / transfo stable. Plvt à 2 stades différents de régénération. Edition simple (SNP). Analysé par NGS

Datas préliminaires



8 samples (pool x 5 cal) =
N= 40 cal (chimériques)
Moyenne **18,3%**

6 samples (pool x 10 plantules) +
1 sample (pool x 3 plantules) =
N= 63 plantules
Moyenne **24,8%**



nature
biotechnology

BRIEF COMMUNICATION
<https://doi.org/10.1038/s41587-021-00868-w>

Check for updates

High-efficiency prime editing with optimized, paired pegRNAs in plants

Qiupeng Lin^{1,2,6}, Shuai Jin^{1,2,6}, Yuan Zong^{1,6}, Hong Yu^{3,6}, Zixu Zhu^{1,2}, Guanwen Liu^{1,2}, Liqian Kou³, Yanpeng Wang^{1,2}, Jin-Long Qiu^{4,5}, Jiayang Li^{2,3} and Caixia Gao^{1,2}

Présentation du plateau AFEG

Espèces /Equipes qui mettent en œuvre des technologies d'édition du génome dans AGAP

- Riz - Equipe DARS et GIV
- Canne à sucre - Equipe SEG

- Hévéa – Equipe BURST/BISSAP
- Vigne - Equipe DAAV
- Cacao - Equipe GSP
- Citrus - Equipe SEAPAG

(ou presque / transfo génétique encore à améliorer)

- Sorgho - Equipe DARS
- Pommier - Equipe AFEF

Appui projet monocotylédone : Anne Cécile Meunier

Appui projet dicotylédone: Céline Georget



Appui du plateau AFEG pouvant aller du simple conseil, à une implication réelle dans les projets, en passant par une palette d'offres de formation pratiques ou théoriques (bioinfo ou paillasse)

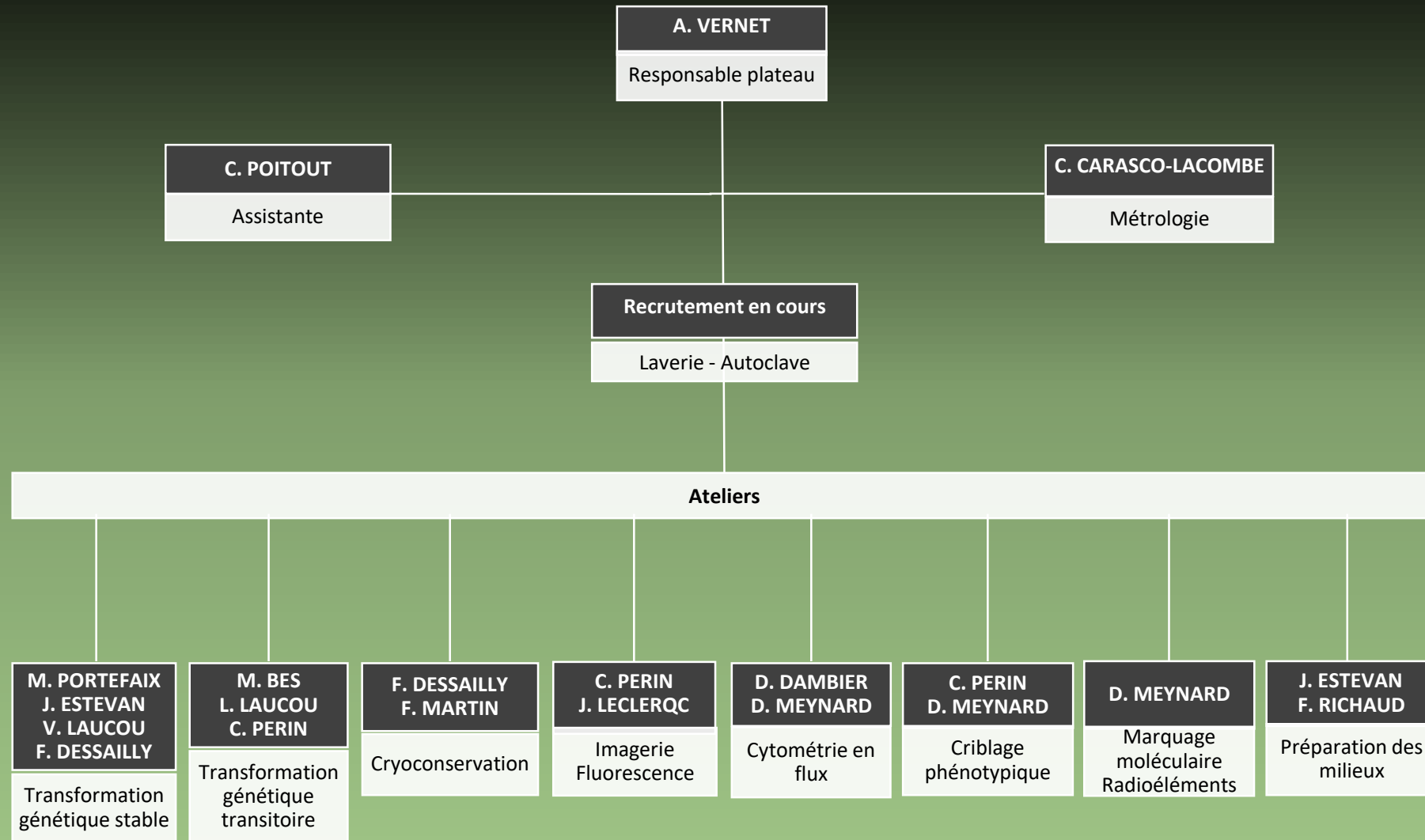


Présentation du plateau InCell: Ingénierie Cellulaire*

***Transformation Génétique et Culture In Vitro**

Responsable opérationnelle : Aurore Vernet
aurore.vernet@cirad.fr

Organigramme Fonctionnel du plateau InCell



Méthodes de transformation maîtrisées

TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE **STABLE**

Les méthodes : Transfert biologique ou indirect

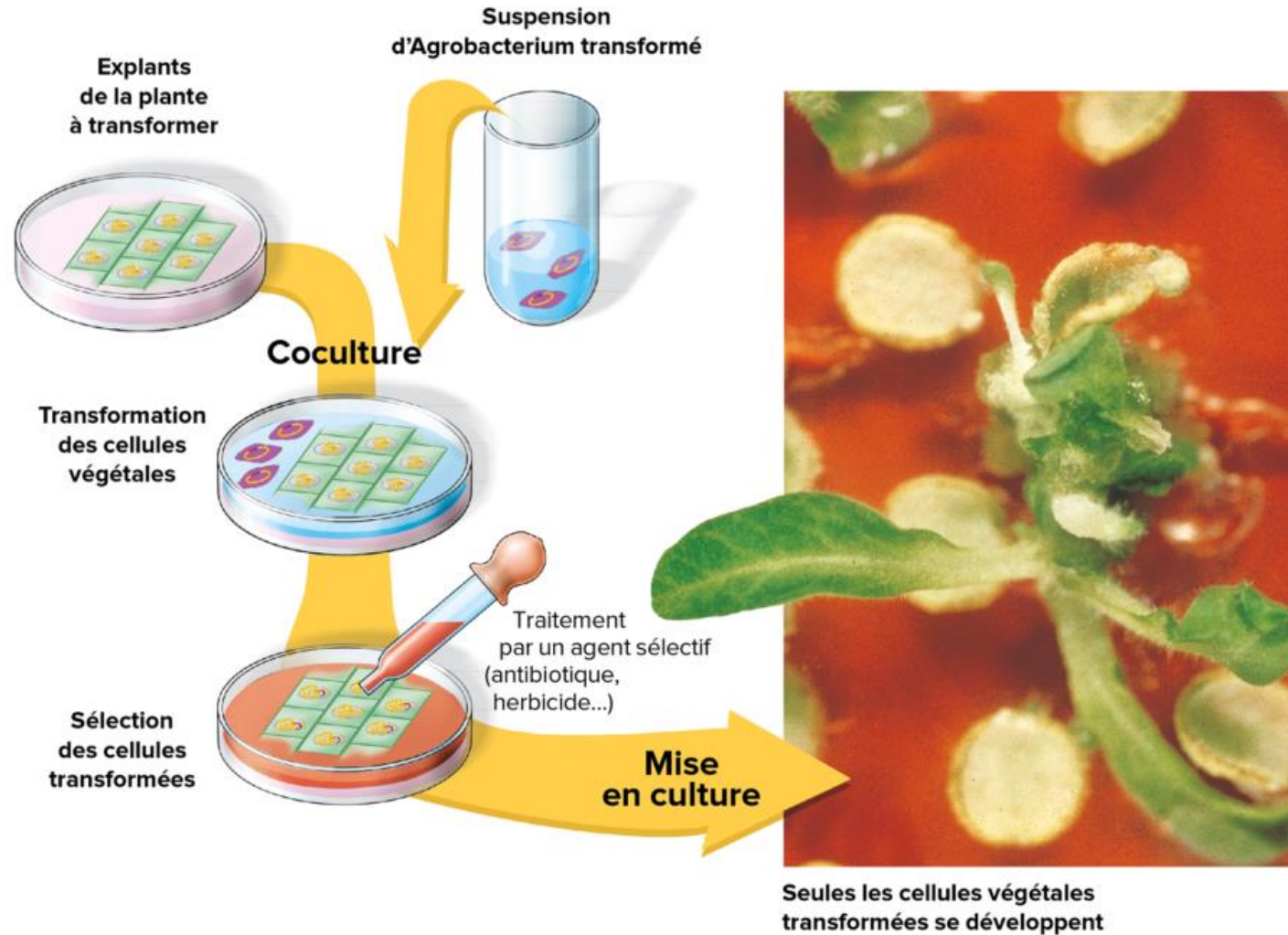
Agrobacterium tumefaciens = bactérie du sol – capacité naturelle à injecter son ADN dans le génome de l'hôte

Utiliser un type de vecteur particulier appelé **T-DNA désarmé**

- **contient des séquences particulières permettant l'insertion**
- **plasmide désarmé (pas de « galle du collet » / gènes de pathogénicité)**

TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE STABLE

Les méthodes : Transfert biologique ou indirect



Méthodes de transformation maîtrisées

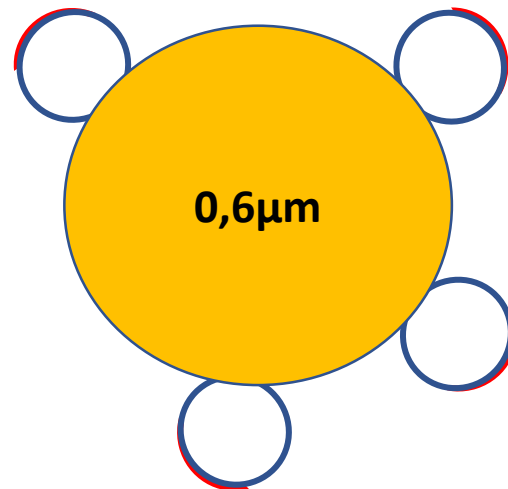
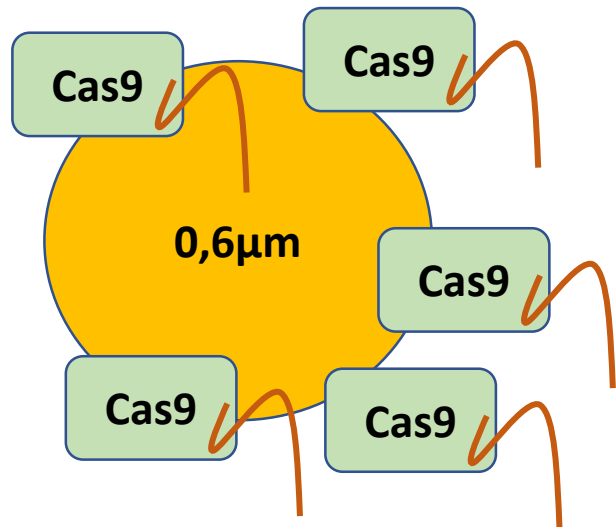
TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE STABLE ou TRANSITOIRE

Les méthodes : Transfert direct

Plasmide ou protéine (pas forcément T-DNA)

Biolistique : canon à particules qui permet de projeter dans les cellules des microparticules (de tungstène ou d'or) enrobées d'ADN ou protéines.

Cause des dégâts / parfois on n'a pas le choix.



PDS-1000/He™ System

Gene Gun



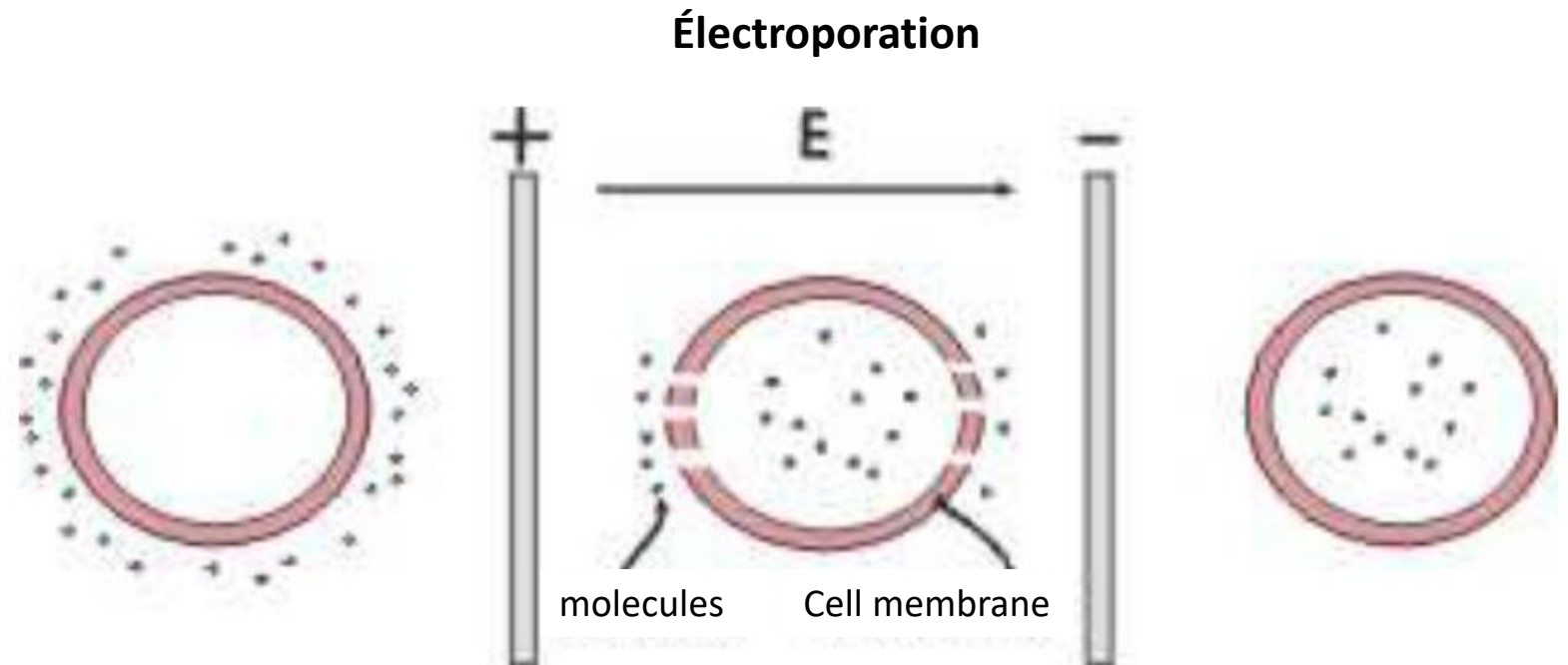
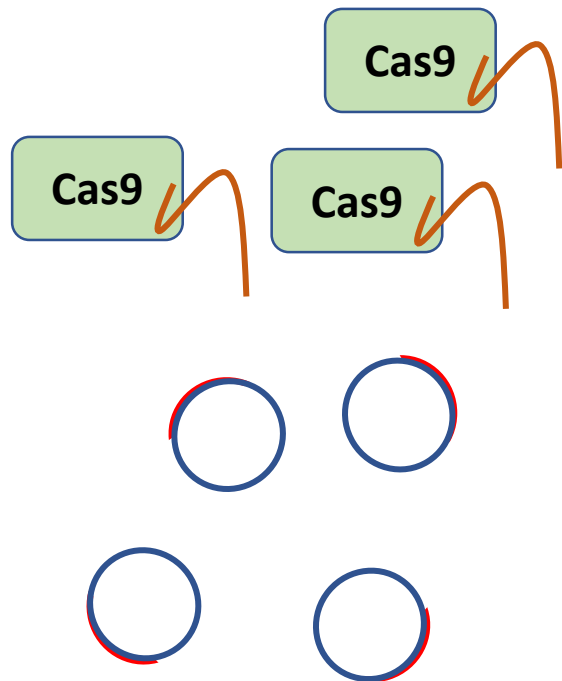
Méthodes de transformation maîtrisées

TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE STABLE ou TRANSITOIRE

Les méthodes : Transfert direct

Plasmide ou protéine (pas forcément T-DNA)

Fragiliser la membrane plasmique de protoplastes (cellules végétales dépourvues de leur paroi) par un choc électrique (**Electroporation**) ou avec un **agent chimique** (type PEG) pour faire pénétrer l'ADN ou les protéines.



Méthodes de transformation maîtrisées

	Stable transformation			Transitory transformation	
	Agrobacterium	Biolistic	Protoplast regeneration	Biolistic	Protoplast
Riz - Equipe DAR et GIV	X	X		X	X
Canne à sucre - Equipe SEG	Sous traitance partenaires argentins				
Sorgho - Equipe DARS	/	/		/	X
Bananier - Equipe GABA	Sous traitance partenaires				/
Hévéa - Equipe BISSAP	X				
Vigne - Equipe DAAV	/				X
Cacao - Equipe GSP	/				
Citrus - Equipe SEAPAG	/		/		X
Pommier - Equipe AFEF	/				
Arabidopsis thaliana	En cours d'implémentation personnels plateaux (C.Georget / A.Vernet)				

Merci aux équipes de l'unité AGAP

Mention spéciale aux équipes DARS et GIV qui soutiennent les projets de développement méthodologique

MERCI POUR VOTRE ATTENTION



Christophe
Périn



Emmanuel
Guiderdoni

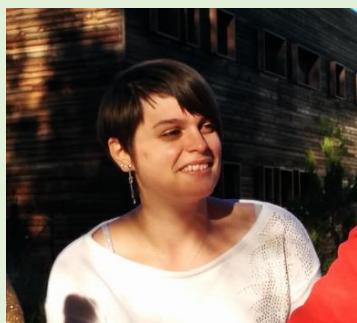


Ian
Fayos

L'équipe plateau (AFEG/InCell)



Céline
Georget



Aurore
Vernet



Anne Cécile
Meunier



Martine
Bès



Murielle
Portefaix



Léo
Herbert



Dylan
Gallo