



INSTITUT

Amélioration génétique et adaptation des  
plantes méditerranéennes et tropicales

# Présentation du plateau



ANALYSE FONCTIONNELLE  
& ÉDITION DES GÉNOMES



Anne-Cécile MEUNIER - CIRAD Montpellier - UMR Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes  
Plateau d'Analyse Fonctionnelle et Edition des Génomes

# 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 :

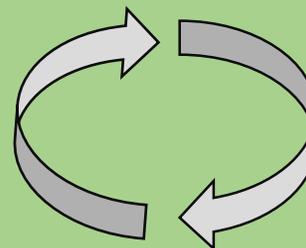
Offre aux scientifiques végétalistes l'environnement et les outils pour conduire des études permettant d'élucider la fonction des gènes (spé: espèces méditerranéennes et tropicales)

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



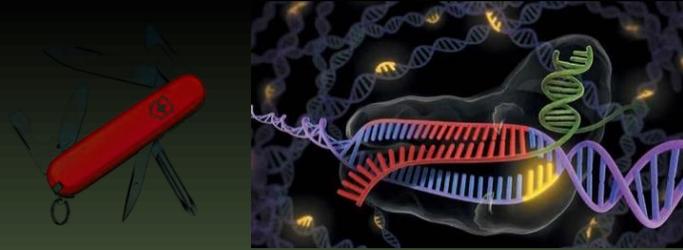
## Plateau InCell :

- Transformation génétique de plante
- Culture In Vitro

*Resp. Aurore Vernet*

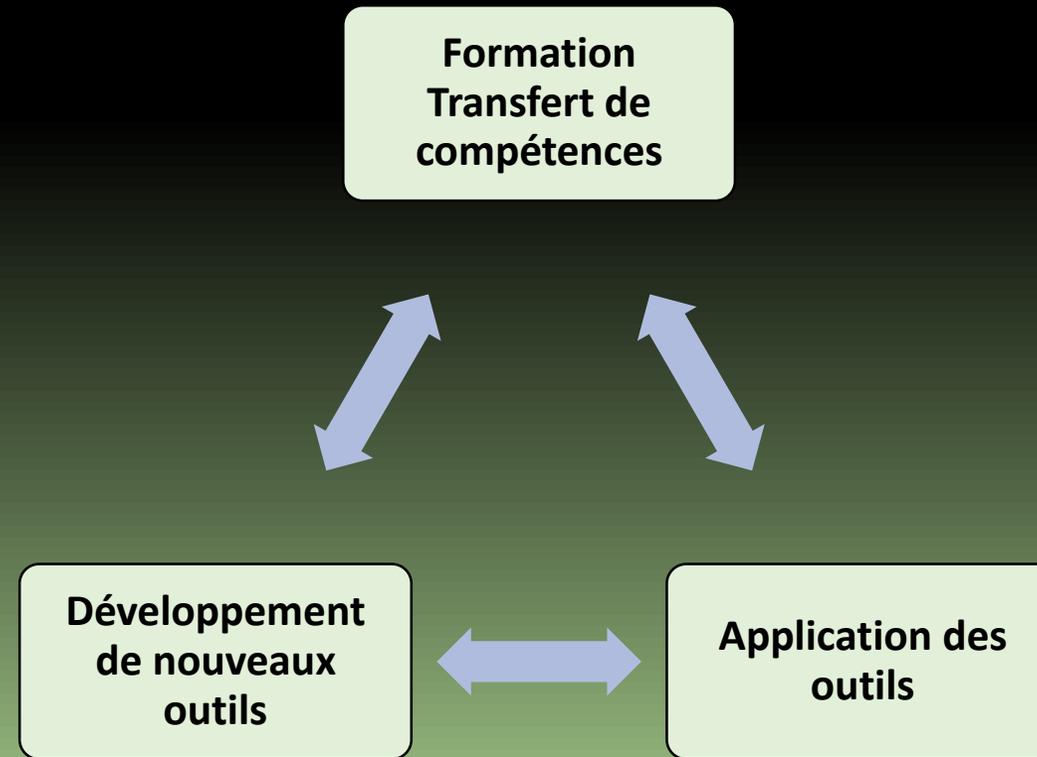
# Présentation du plateau AFEG

Septembre 2017 : Création du plateau



➤ Missions scientifique du personnel\* :

\*expertise Édition des Génomes



*(+ gestion opérationnelle et appui administratif et budgétaire plateau)*

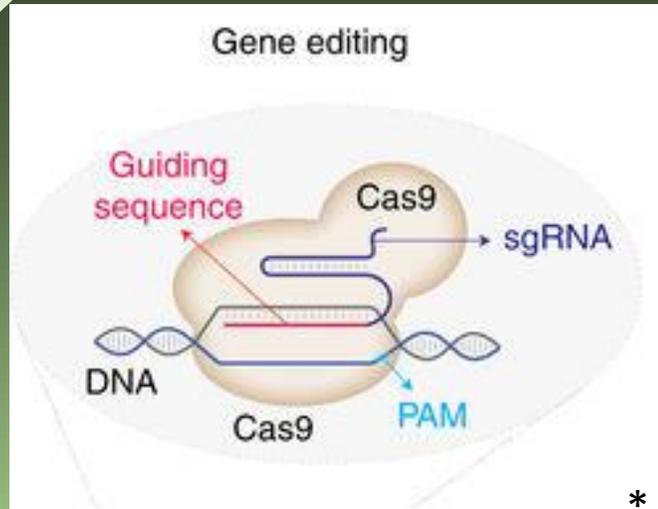
## Les projets :

### 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*

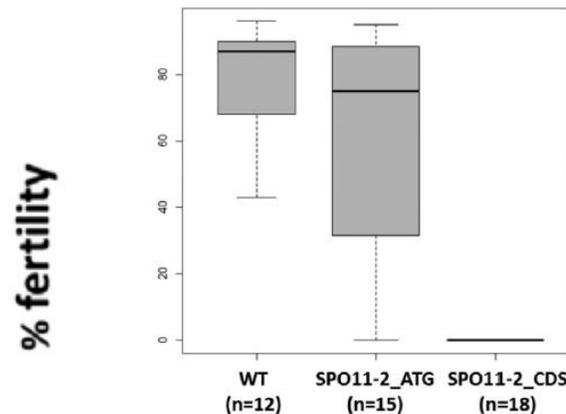
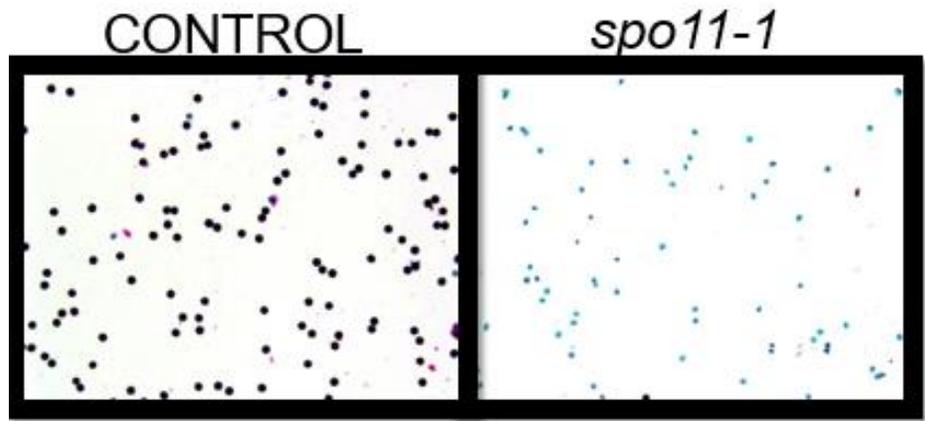
*\*\* Modified from Zaidi et al, 2017*

## 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 :

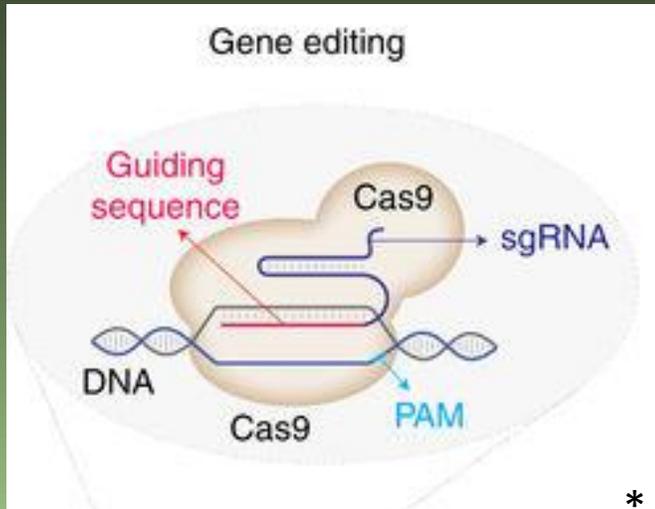
### ANALYSE FONCTIONNELLE DE GENES

- 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)

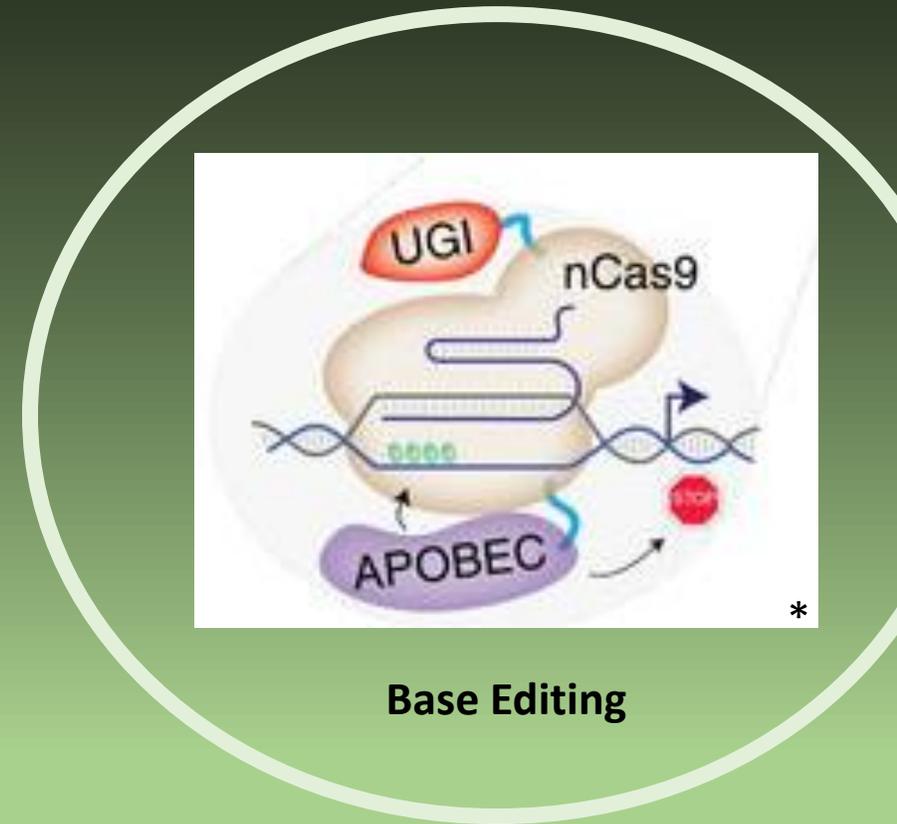
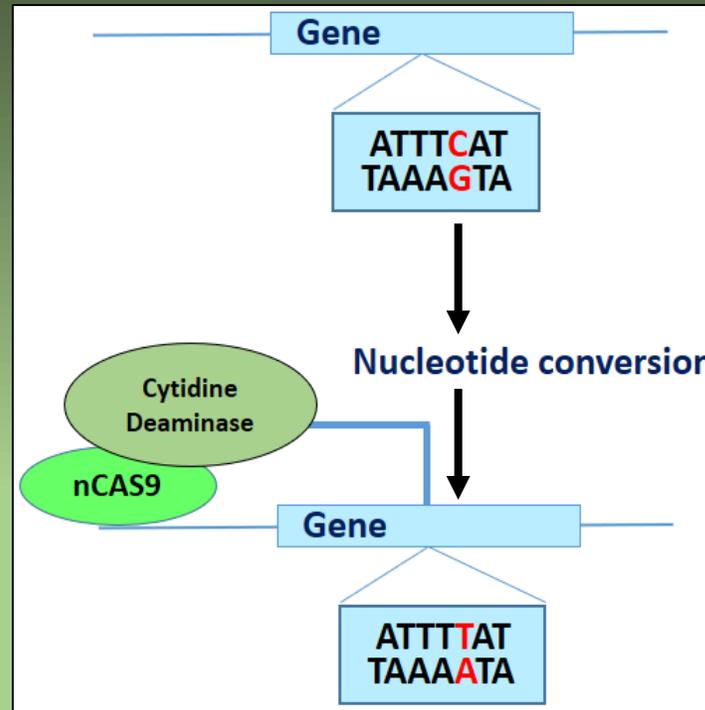
### DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE

# Présentation du plateau AFEG

## Les outils dont nous disposons sur le plateau



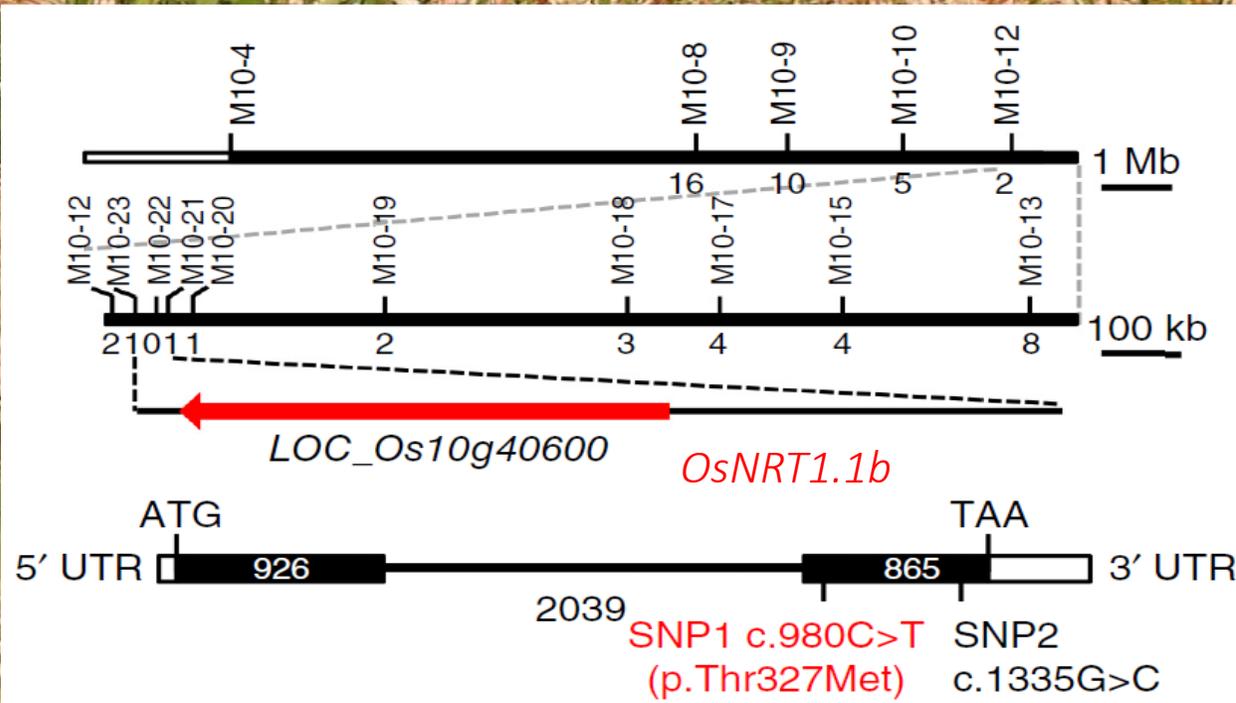
CRISPR/Cas9



Base Editing

\* Modified from Mazhar Adli, 2018

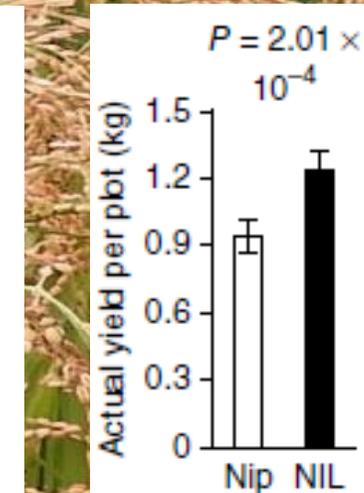
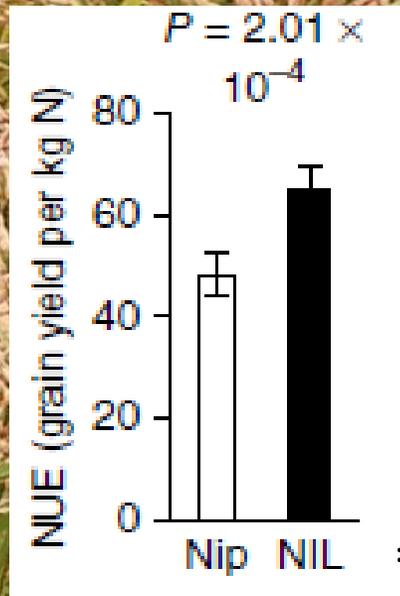
\*\* Modified from Zaidi et al, 2017



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

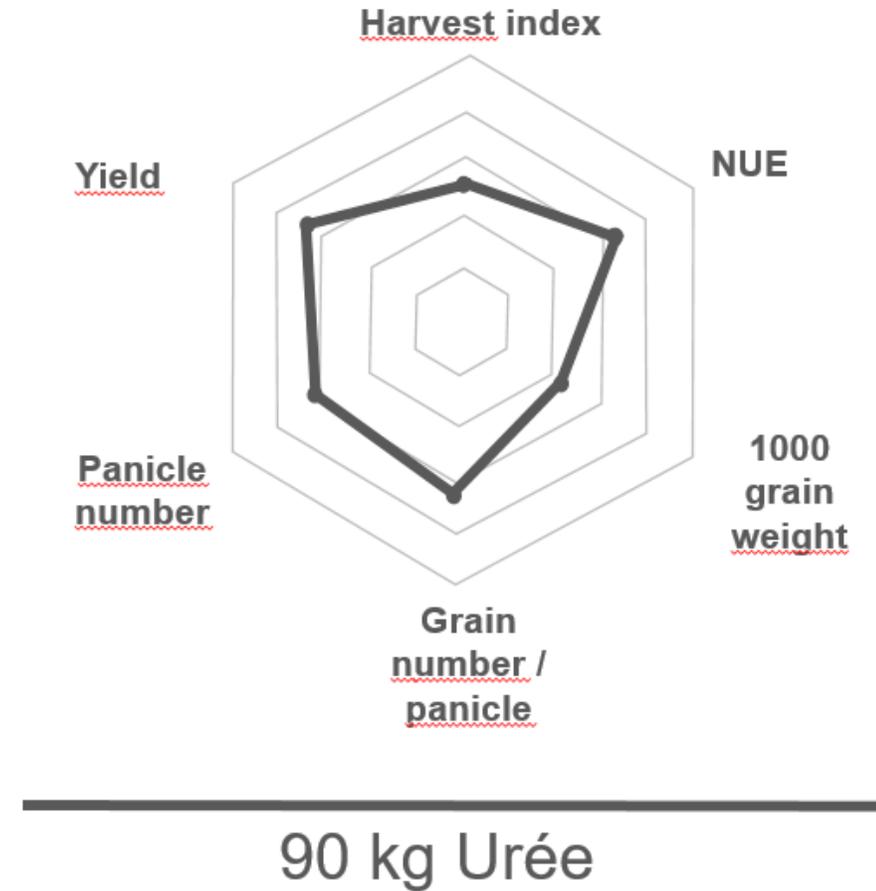
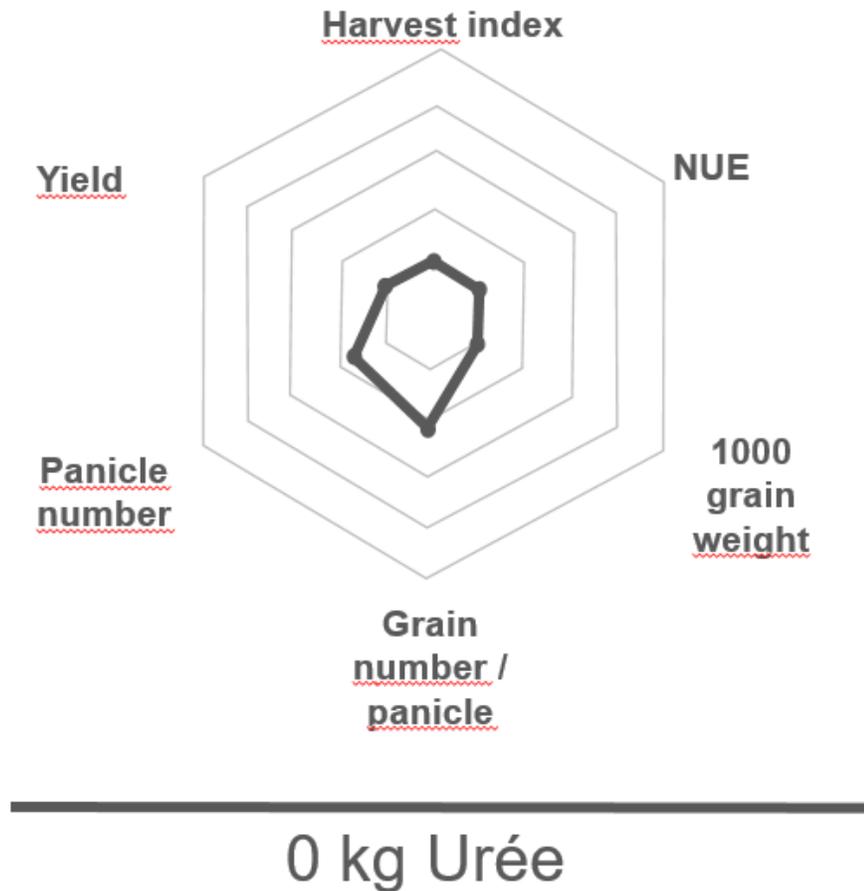
Mesure de divers paramètres agronomiques



Photo : CIAT

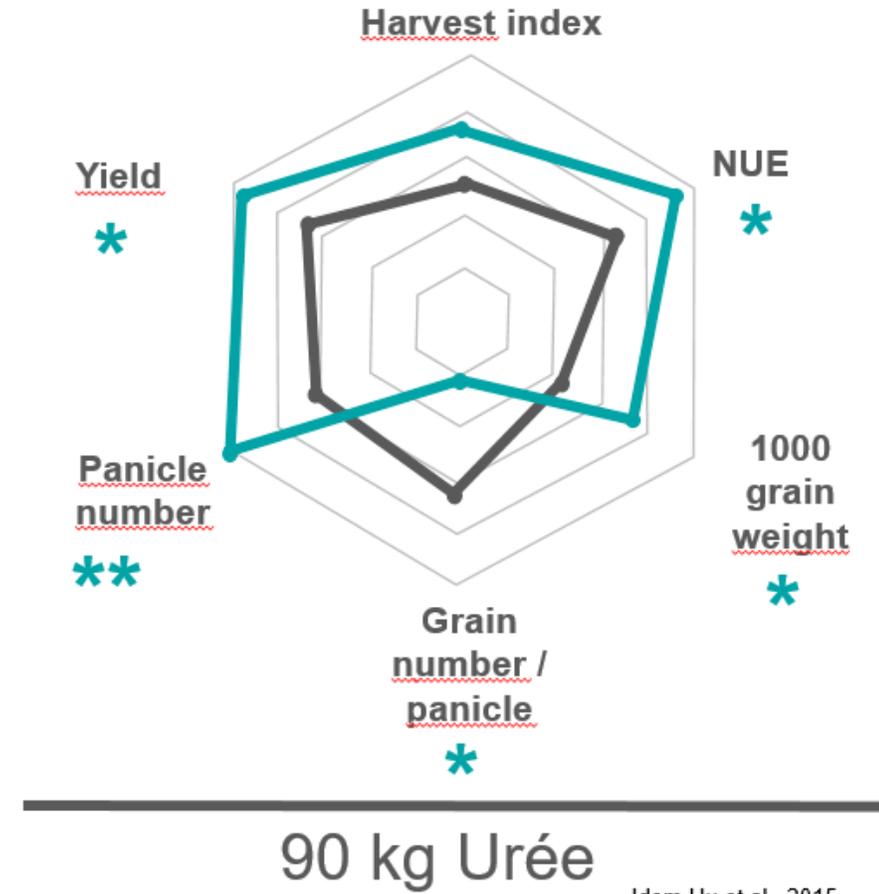
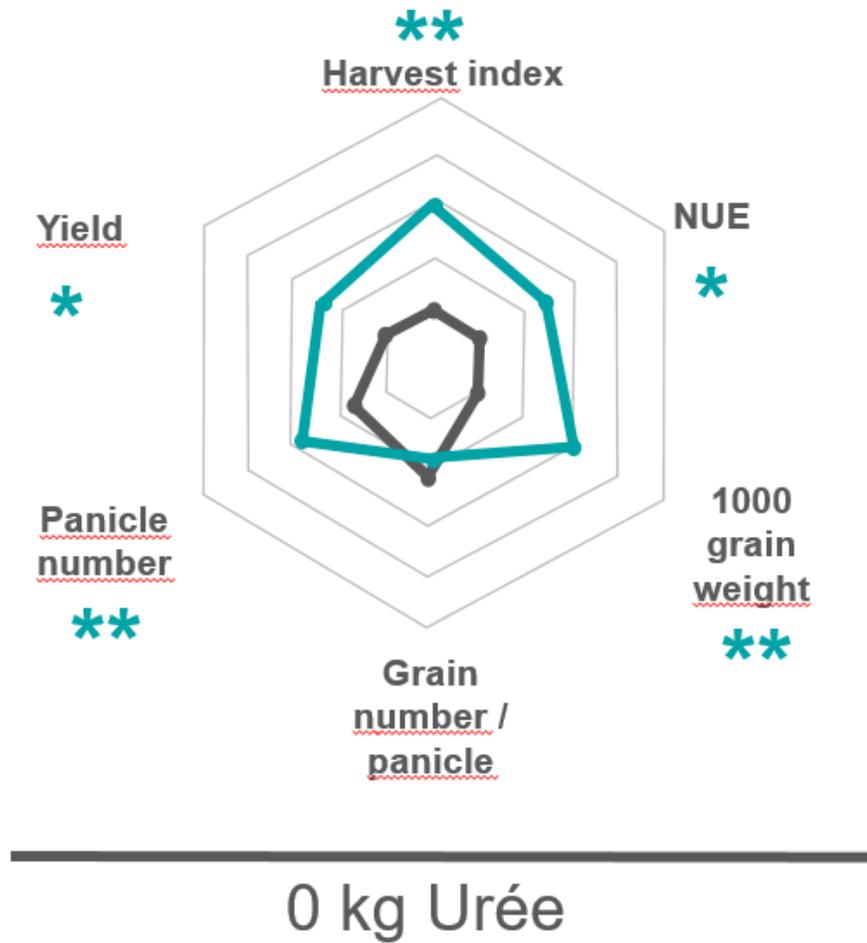
# RADAR of WT NRT1.1b-C

Thèse Léo Herbert



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

Thèse Léo Herbert

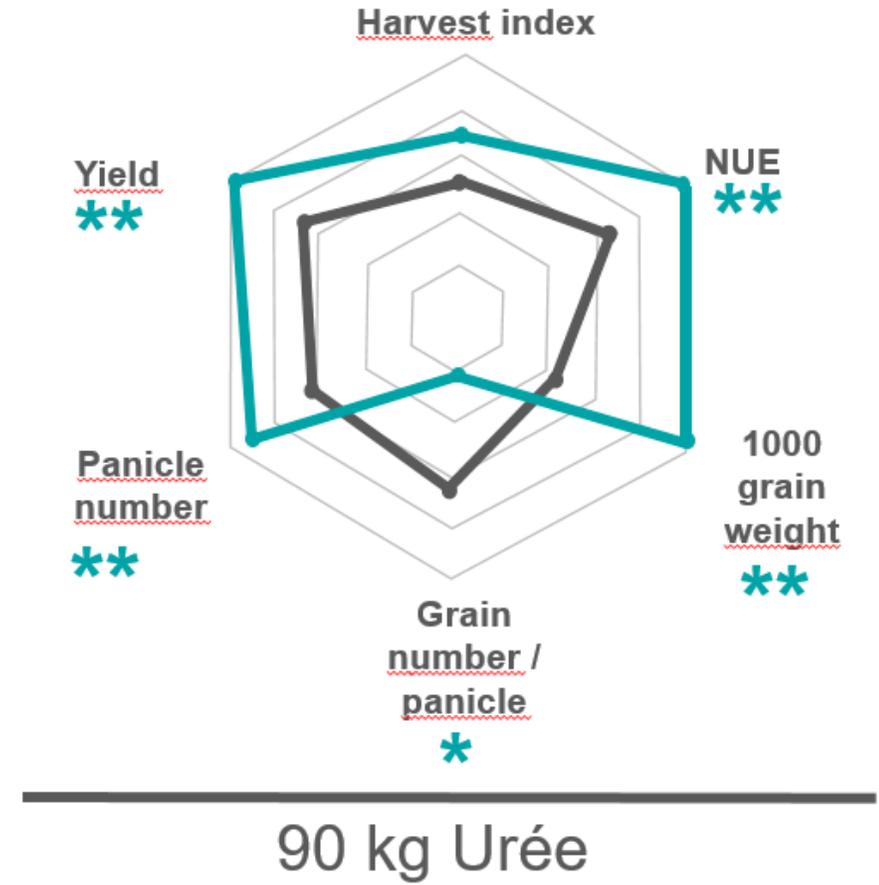
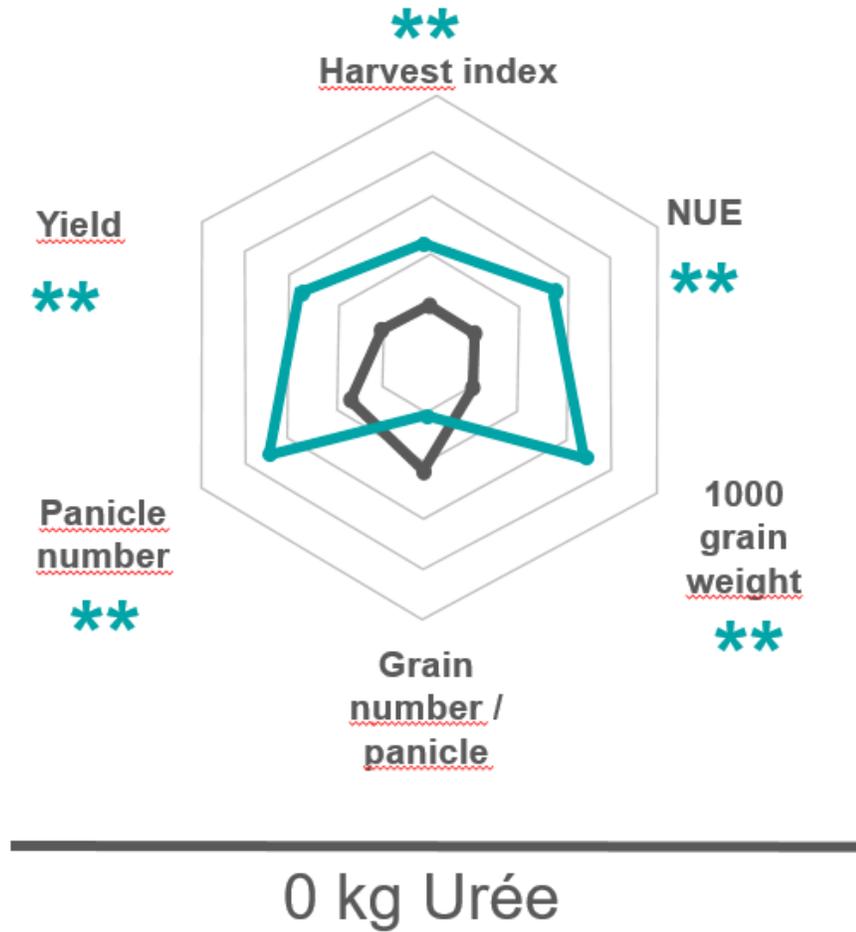


Idem Hu et al., 2015

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)

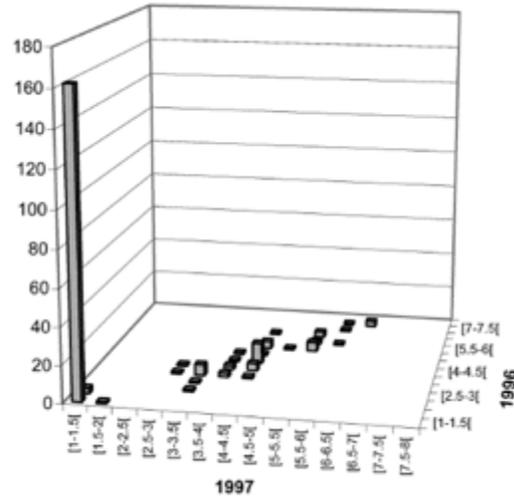
### DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE

# 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*



700 progeny of R570 (selfed) evaluated:

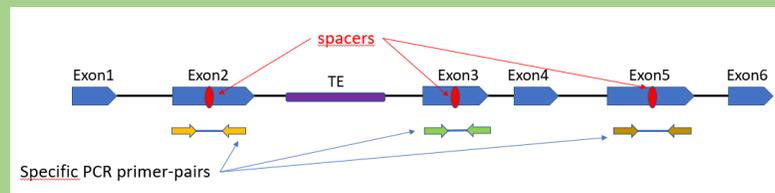
→ a major resistance gene

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

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

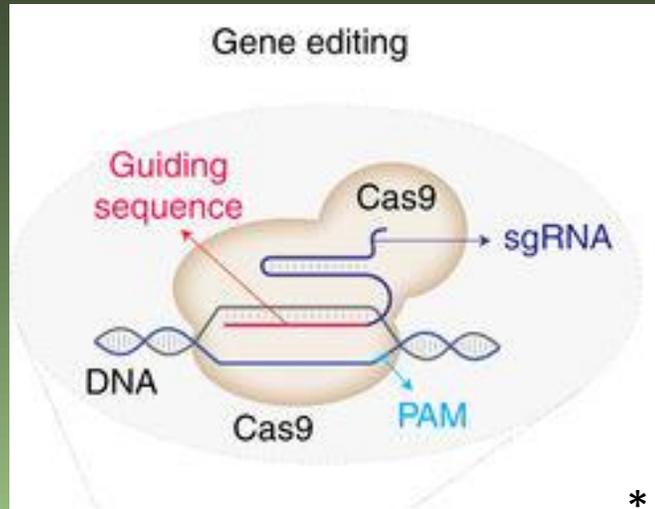
- Etude des gènes impliqués dans la recombinaison méiotique (Diversité génétique)
- Etude de gènes impliqués dans le développement et l'adaptation/la réponse aux stress abiotiques (environnementaux)
- Etude de gènes impliqués dans la réponse aux stress biotiques (pathogène)

### DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE

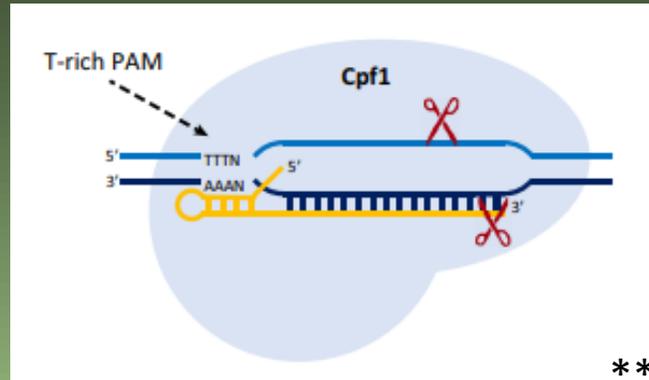


# Présentation du plateau AFEG

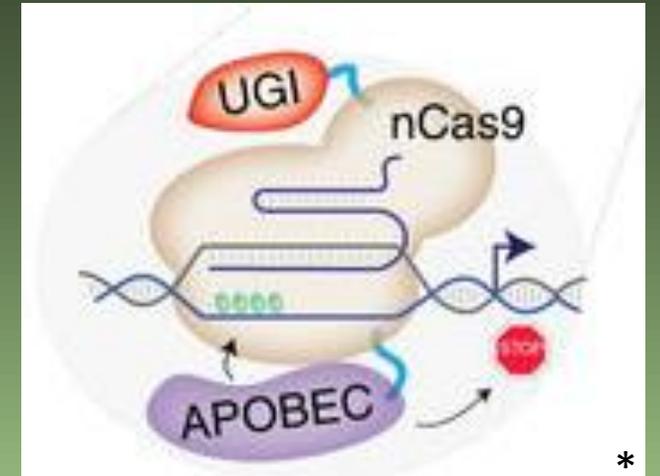
## Les outils dont nous disposons sur le plateau



CRISPR/Cas9



CRISPR/Cpf1

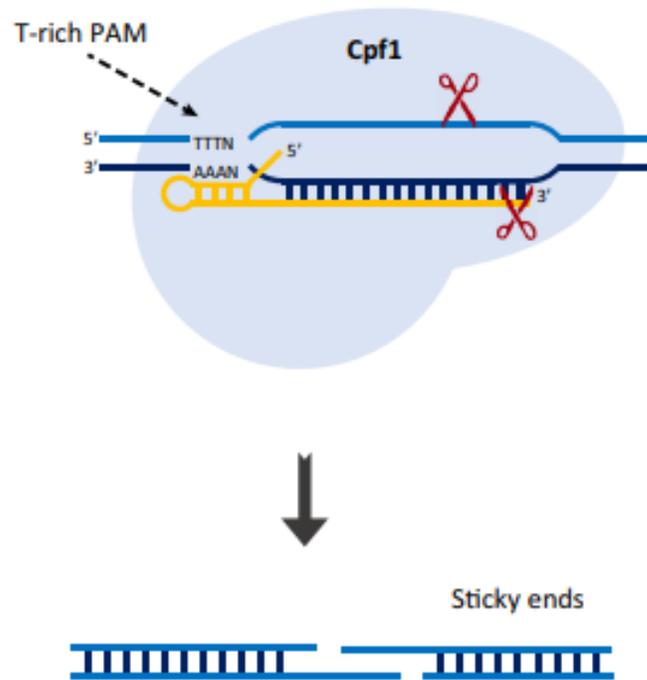


Base Editing

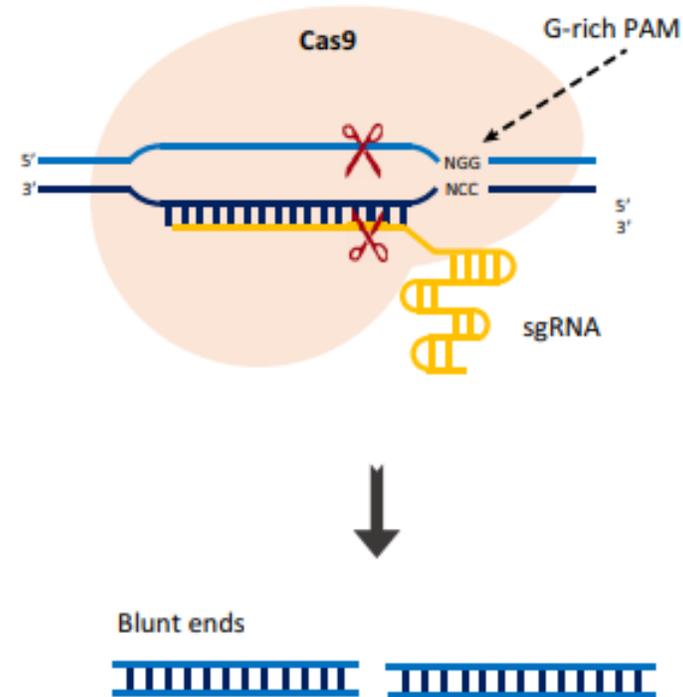
\* Modified from Mazhar Adli, 2018

\*\* Modified from Zaidi et al, 2017

(A) CRISPR-Cpf1



(B) CRISPR-Cas9



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



## 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)
ATATCGAACCGGACCACCTCAAGAcggettgggtgAcATCCAAGAA +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

```

GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCATCATCACCGAGCACCCGCATACACCTTGA WT [x4]
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCATCA---CCGAGCACCCGCATACACCTTGA -3 [x10] 2 homo
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTC-----GAGCACCCGCATACACCTTGA -10 [x2] homo
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCAT-----GAGCACCCGCATACACCTTGA -7 [x2]
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCATCA-----GCACCCGCATACACCTTGA -7 [x2]
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCAT-----AGCACCCGCATACACCTTGA -8 [x2]
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCAT----ACCGAGCACCCGCATACACCTTGA -4
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCATCA----GAGCACCCGCATACACCTTGA -5
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCATC----CGAGCACCCGCATACACCTTGA -5
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCA-----GAGCACCCGCATACACCTTGA -8
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCAT-----GCACCCGCATACACCTTGA -9
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCA-----GCACCCGCATACACCTTGA -10
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTC-----GCACCCGCATACACCTTGA -12
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCC-----ACCGCATACACCTTGA -13
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCC-----CCGCATACACCTTGA -14
GTTGTTCTTTGCA-----CACCGAGCACCCGCATACACCTTGA -16
GTTGTTCTTTGCATAGTCAGCTCCA-----TACACCTTGA -18
GTTGTTCTTTGCA-----ATACACCTTGA -26
    
```



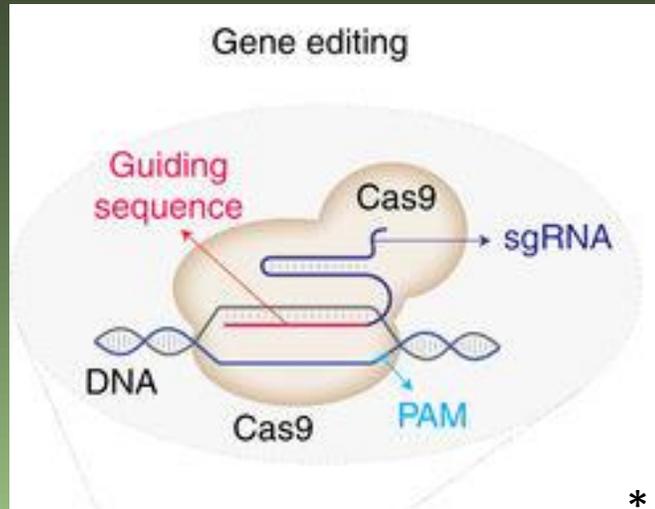
Herbert et al, 2020

Type de mutations obtenus différents entre les 2 nucléases

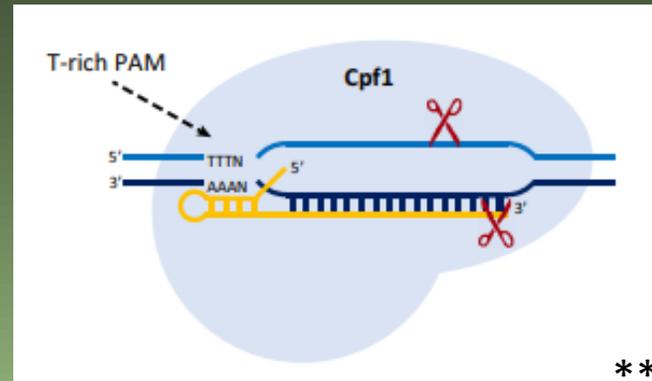
Intérêt CPF1: Délétion d'un domaine protéique / groupe acides aminés *sans décalage de phase*  
Ciblage de régions régulatrices / promotrices... etc

# Présentation du plateau AFEG

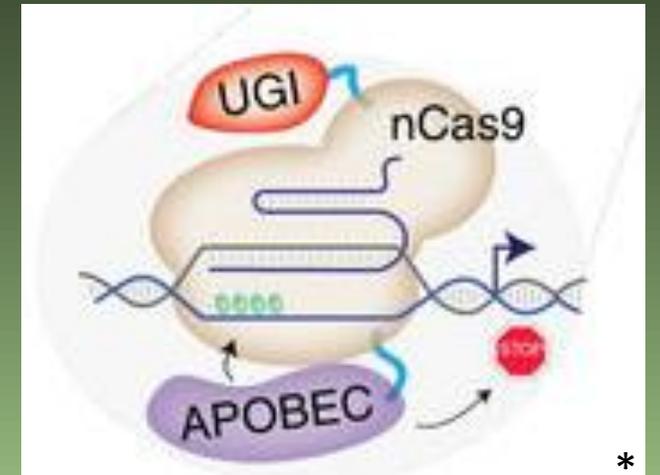
## Les outils dont nous disposons sur le plateau



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 :

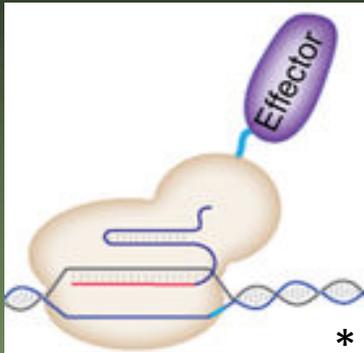
### ANALYSE FONCTIONNELLE DE GENES

- 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)

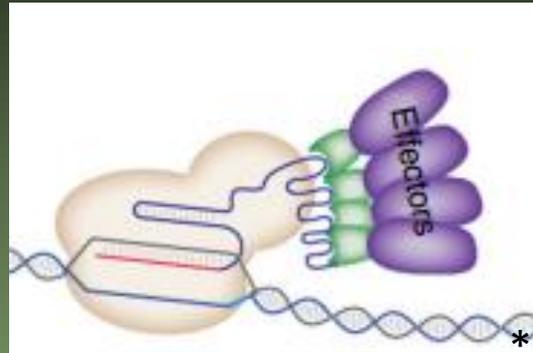
### DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE

# Présentation du plateau AFEG

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



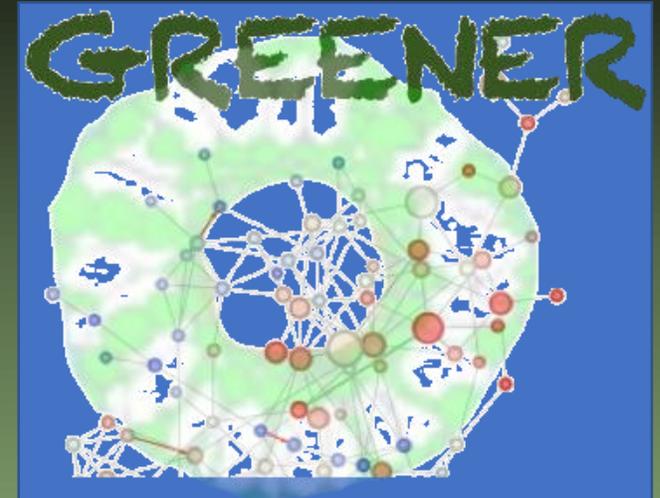
dCas9-fusion



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

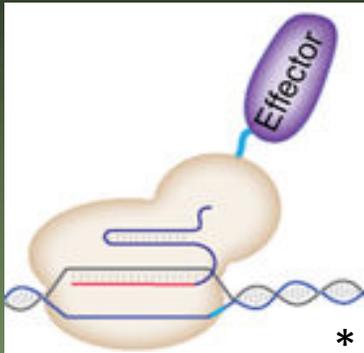
- Appui conseil expertise du plateau
- Suivi du développement



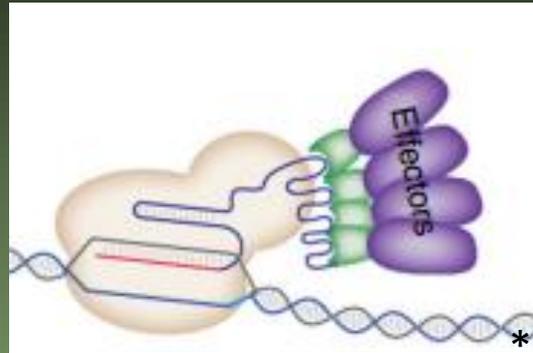
Seront ensuite ajoutés à la « banque d'outils » du plateau

# Présentation du plateau AFEG

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



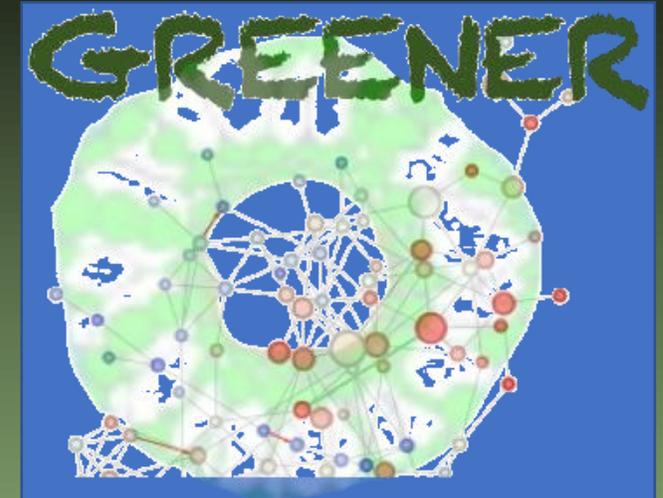
dCas9-fusion



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

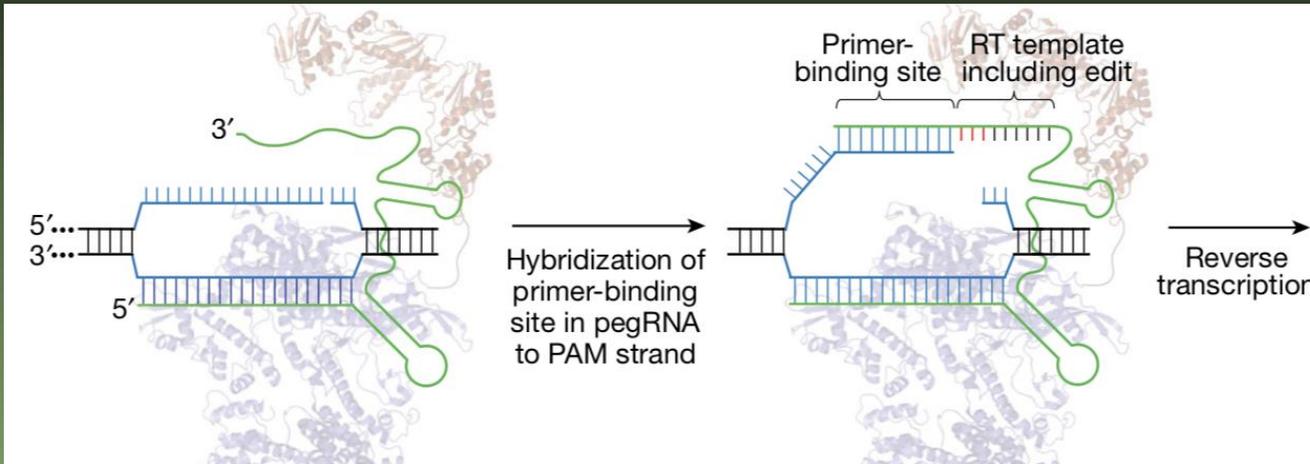
Des projets dans lesquels des outils/méthodos sont développées par les personnels plateaux (encore rares)

- 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

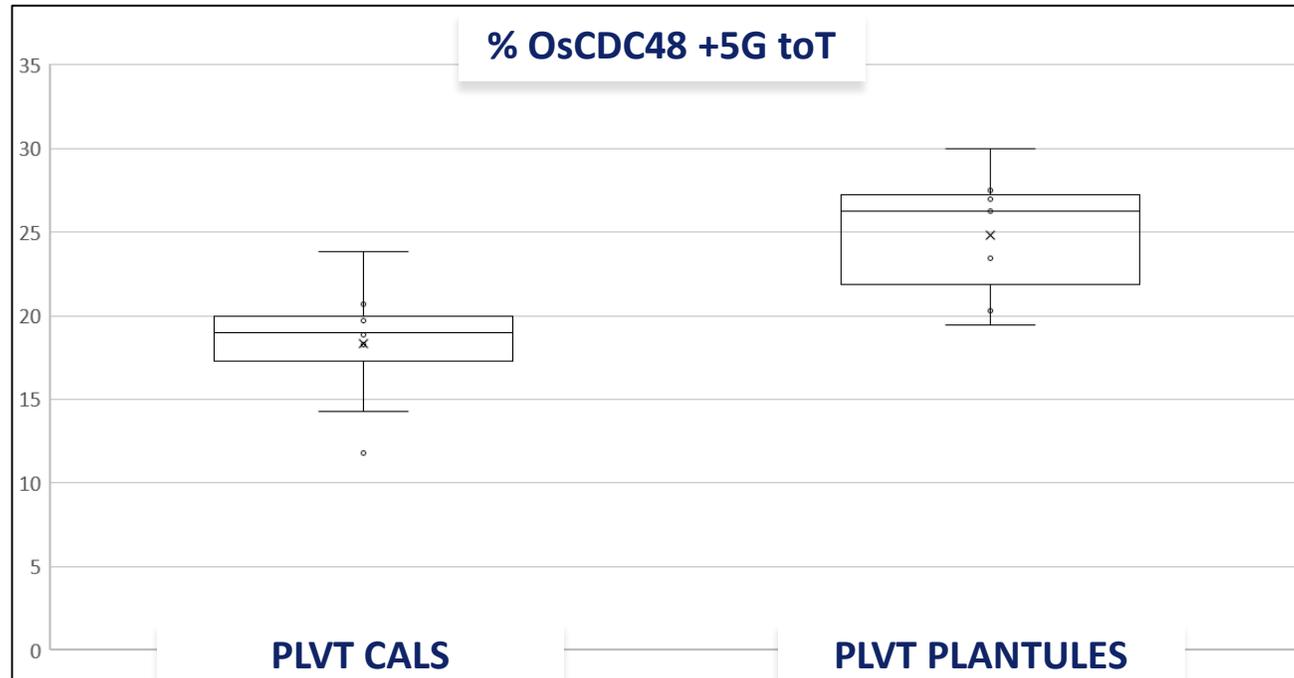
**TYPEX Project (2023-2028):  
Toward highly Predictable Editing  
of the plant genome leXicon.**

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



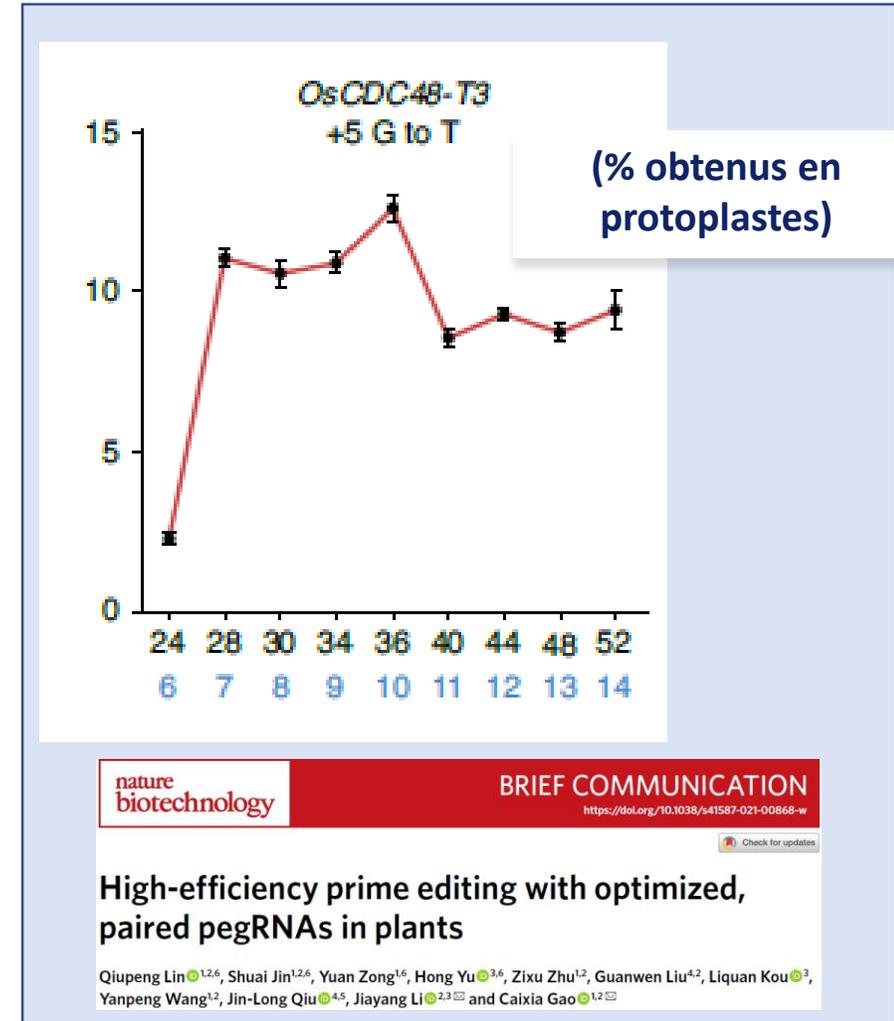
Premiers essais d'un Outil Prime Editing classique « Customisé » par le plateau AFEG/InCell.  
Riz / transfo stable. Plvt à 2 stades différents de régénération. Edition simple (SNP). Analysé par NGS

## 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%**



# 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)**

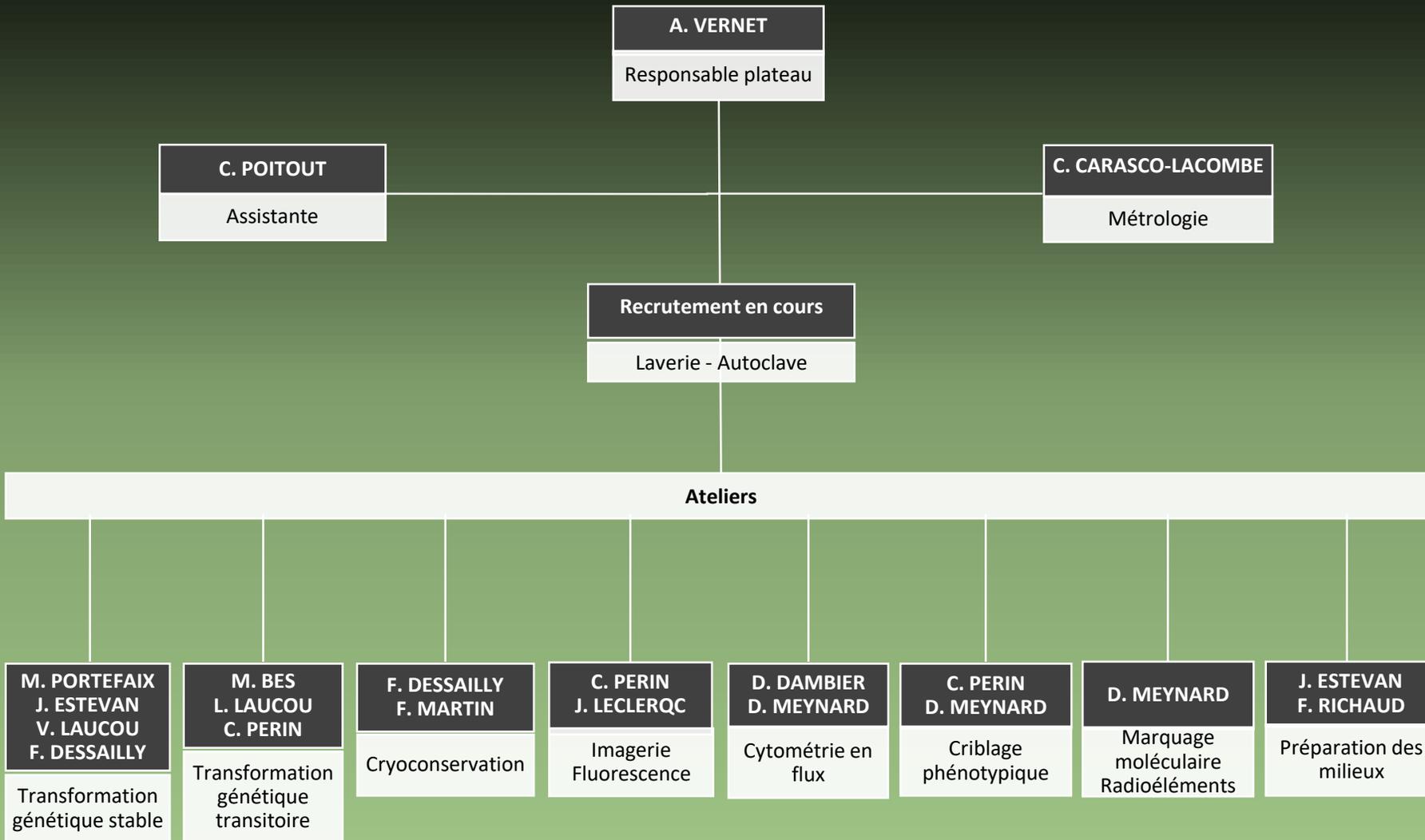


# **Présentation du plateau InCell: Ingénierie Cellulaire\***

**\*Transformation Génétique et Culture In Vitro**

**Responsable opérationnelle : Aurore Vernet**  
**[aurore.vernet@cirad.fr](mailto:aurore.vernet@cirad.fr)**

# Organigramme Fonctionnel du plateau InCell



# Méthodes de transformation maîtrisées

## TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE **STABLE**

### Les méthodes : Transfert biologique ou indirect

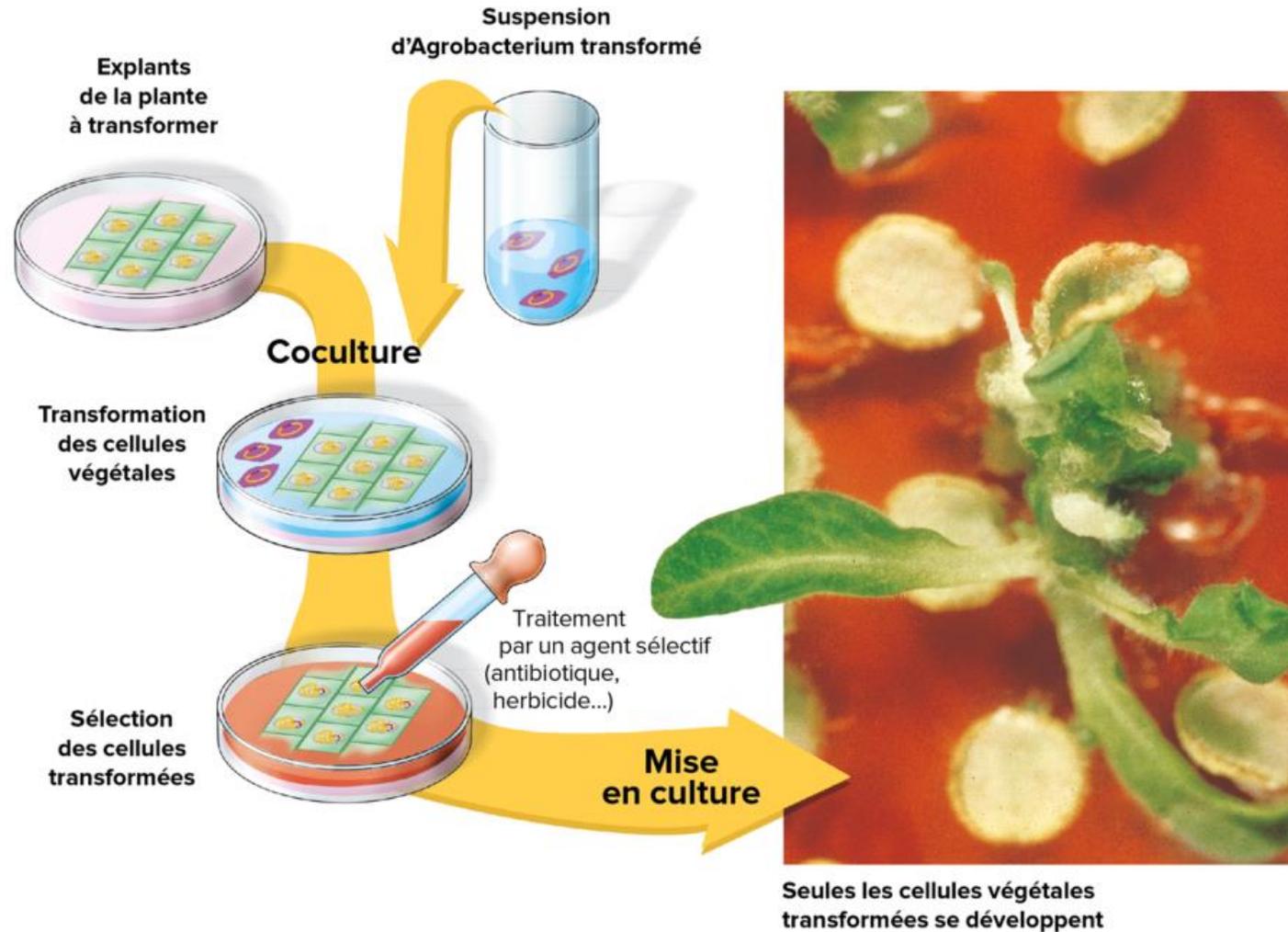
**Agrobacterium tumefaciens** = bactérie du sol – capacité naturelle à injecter son ADN dans le génome de l'hôte

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

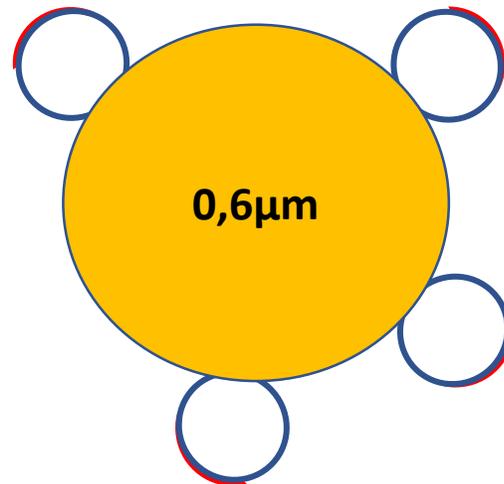
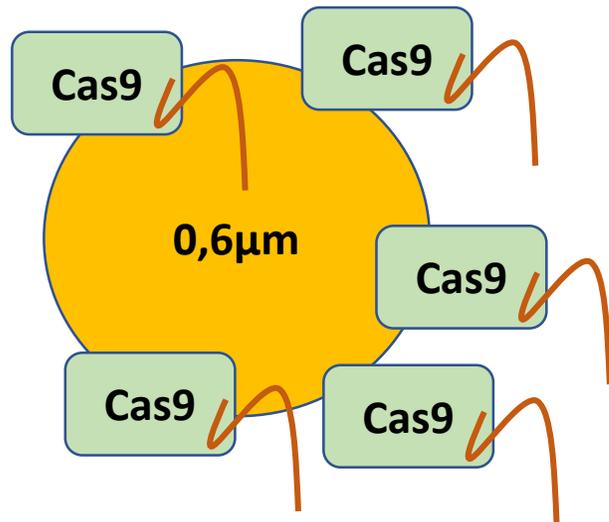
## TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE STABLE ou TRANSITOIRE

### 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



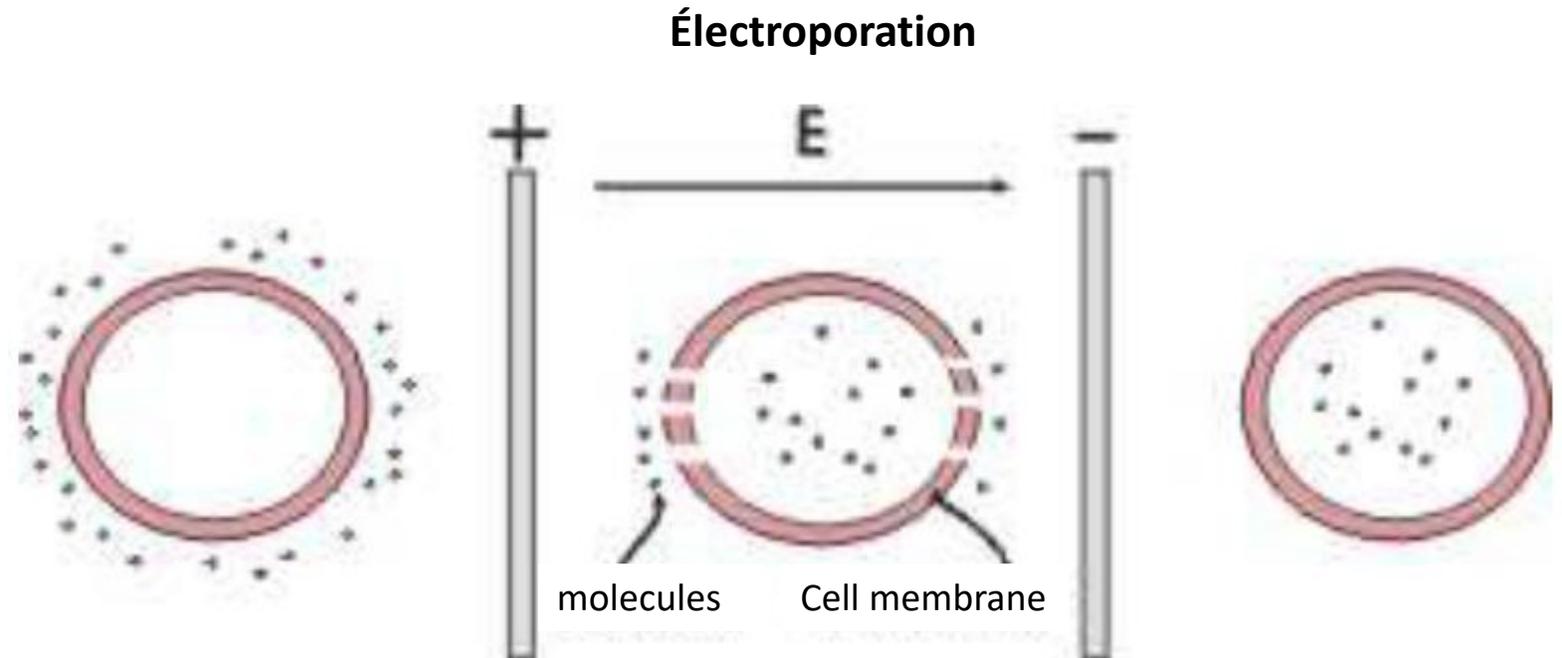
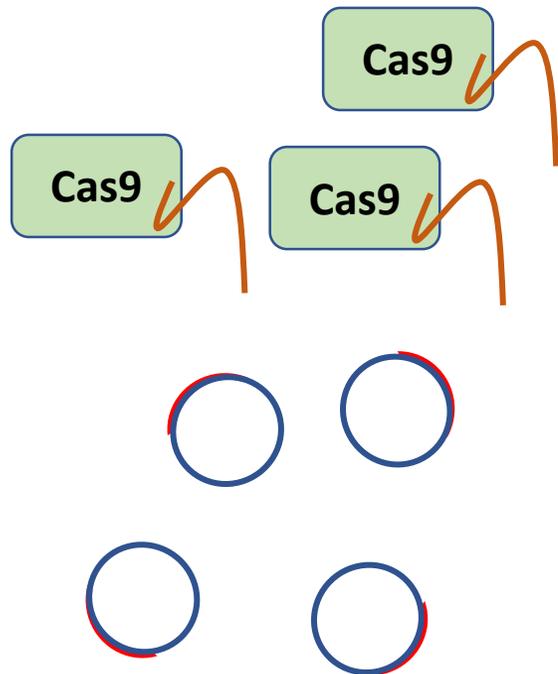
# Méthodes de transformation maîtrisées

## 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