



HAL
open science

Mise au point du ciblage génique chez la tomate

Célia Casset

► **To cite this version:**

Célia Casset. Mise au point du ciblage génique chez la tomate. Sciences du Vivant [q-bio]. 2015.
hal-02798194

HAL Id: hal-02798194

<https://hal.inrae.fr/hal-02798194v1>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année universitaire : **2014-2015**

Spécialité :

Productions et Technologies du Végétal

Spécialisation (et option éventuelle) :

Innovation Variétale

Mémoire de Fin d'Études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Mise au point du ciblage génique chez la tomate

Célia CASSET



Soutenu à Rennes le 17 septembre 2015

Devant le jury composé de :

Président : Mélanie Jubault

Maître de stage : Marianne Mazier

Enseignant référent : Mélanie Jubault

Autres membres du jury (Nom, Qualité)

Laura Chauvin, Rapporteur

Maria Manzanares-Dauleux, Examineur

REMERCIEMENTS

En premier lieu, merci à Véronique Lefèvre, la directrice d'unité, pour m'avoir permis de réaliser ce stage au sein du GAFL.

Ce stage n'aurait pas été possible sans Marianne Mazier, que je tiens à remercier pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet aussi intéressant. Merci à elle pour sa patience, sa disponibilité, pour avoir partagé son expertise en transformation et aussi pour avoir eu le courage de corriger mon rapport, ce qui n'a pas dû être une mince affaire.

Un grand merci aussi à Benoit Danilo pour sa gentillesse, son aide précieuse (surtout avec les protoplastes), ses conseils sur tout ce qui touche à la biologie moléculaire et pour avoir participé à la correction de mon rapport.

Merci à Emmanuel Botton pour son aide avec les milieux, et sans qui les repiquages d'explants auraient été bien plus monotones.

Merci à Fabien Nogué pour sa disponibilité et ses conseils avisés sur les stratégies de clonage et tout ce qui touche aux CRISPR.

Merci à toute l'équipe ReV pour la bonne ambiance. En particulier merci à Jean Luc Gallois pour ses conseils, à Caroline Lebaron pour son aide avec les commandes et conseils, à Baptiste pour sa constante gentillesse et bonne humeur et à Camille pour sa générosité.

Merci à l'équipe GDEC de l'INRA de Clermont-Ferrand pour nous avoir accueillis et permis d'utiliser leur canon à particules, et en particulier à Anne Partier pour avoir pris le temps de nous expliquer comment procéder pour le bombardement et pour sa disponibilité.

Merci à Renaud Dubosc, Christopher Sauvage, Elise Albert et Lilian Fontanet pour avoir fait de la pause déjeuner un moment très agréable.

Enfin, merci à tous les membres du laboratoire pour m'avoir soutenue et permis d'effectuer ce stage dans les meilleures conditions.

TABLE DES MATIERES

I.	INTRODUCTION	1
A.	LE PROJET GENIUS	1
B.	LES OUTILS DE CIBLAGE DU GENOME	2
C.	EIF4E ET RESISTANCE AUX VIRUS	4
D.	OBJECTIFS	5
II.	MATERIEL ET METHODES	6
	MATERIEL	6
A.	MATERIEL VEGETAL	6
B.	SOUCHES BACTERIENNES	6
C.	CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES	6
	METHODES	7
A.	PREPARATION DES SEMIS	7
B.	TRANSGENESE	7
1.	<i>Transformation transitoire en protoplastes</i>	7
2.	<i>Transformation stable</i>	8
3.	<i>Extraction de l'ADN génomique</i>	9
4.	<i>Détection des modifications</i>	10
C.	CLONAGES MOLECULAIRES	10
D.	REALISATION DES CONSTRUCTIONS TALEN®, CRISPR ET MATRICE DE REMPLACEMENT	11
III.	RESULTATS	12
A.	MISE AU POINT DES CRISPR POUR LA MODIFICATION D'ALLELE	12
1.	<i>Mise au point des cibles CRISPR</i>	13
2.	<i>Mise au point de la matrice de remplacement pour les CRISPR</i>	13
3.	<i>Expression transitoire des CRISPR en protoplaste</i>	14
4.	<i>Transformation stable par biolistique avec les CRISPR</i>	14
B.	MISE EN ŒUVRE DES TALEN® CHEZ LA TOMATE	15
1.	<i>Transformation stable par biolistique</i>	15
2.	<i>Recherche de la modification ciblée de eIF4E</i>	18
IV.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	19
V.	CONCLUSION	22
VI.	BIBLIOGRAPHIE	23
A.	BIBLIOGRAPHIE	23
B.	SITOGRAPHIE	25

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A. thaliana : *Arabidopsis thaliana*

A. tumefaciens : *Agrobacterium tumefaciens*

ADN : Acide Desoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ARNsg : ARN single guide

Cas9 : CRISPR associated protein 9

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats

crRNA : CRISPR RNA

CsCMV : Cassava Common Mosaic Virus

DO : Densité Optique

GENIUS : Genome ENgineering Improvement for Useful plants of a Sustainable agriculture

HDR : Homology Directed Repair

Indel : Insertion-délétion

NEB : New England Biolabs

NHEJ : Non Homologous End Joining

PAM : Protospacer Adjacent Motif

Pb : paires de bases

Rpm : rotation par minute

RVD : Repeat Variable Di-residues

SDN : Site Directed Nuclease

TALEN®: Transcription activator-like effector nuclease

tracrRNA : trans-activated CRISPR RNA

VPg : Viral genome-linked Protein

WVA106 : West Virginia 106

ZFN : Zinc Finger Nuclease

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1.	Lots de travaux (LT) du projet GENIUS.	2
Figure 2.	Deux voies de réparation des coupures double brin : NHEJ et HDR.	2
Figure 3.	Structure des ZFN et TALEN® et spécificité de reconnaissance.	3
Figure 4.	Immunité adaptative médiée par CRISPR/Cas9 chez les bactéries.	3
Figure 5.	Fusion du crRNA et du tracrRNA pour former un unique ARN chimérique sgRNA.	4
Figure 6.	Organisation du complexe d'initiation de la traduction eucaryote.	4
Figure 7.	Régions de eIF4E impliquées dans la résistance aux potyvirus.	5
Figure 8.	Sites de reconnaissance des TALEN® sur eIF4E.	6
Figure 9.	Matrice de remplacement initiale comportant la mutation pep1 (CCT->ACA).	7
Figure 10.	Principe du système de recombinaison Gateway.	10
Figure 11.	Principe de la mutagenèse dirigée.	11
Figure 12.	Construction des vecteurs binaires contenant chaque paire de TALEN®.	11
Figure 13.	Définition des cibles CRISPR sur <i>eIF4E</i>	13
Figure 14.	Mise au point des CRISPR ciblant l'exon 1.	13
Figure 15.	Matrices de remplacement version CRISPR au niveau de l'exon 1.	14
Figure 16.	Détection des coupures par les CRISPR en expression transitoire par PCR.	14
Figure 17.	Récapitulatif des étapes clés de la première expérience de transformation par biolistique.	15
Figure 18.	Profil PCR des cinq plantules modifiées obtenues.	18
Figure 19.	Séquençage de la plantule 222.	18
Figure 20.	Représentation de l'évènement d'insertion de la matrice au niveau de <i>eIF4E</i>	19

Tableaux

Tableau 1.	Récapitulatif des constructions à disposition.....	6
Tableau 2.	Amorces utilisées pour l'analyse moléculaire des plantules.....	10
Tableau 3.	Amorces utilisées pour la construction des CRISPR.	12
Tableau 4.	Amorces utilisées pour la modification de la matrice TALEN®.	12
Tableau 5.	Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée.	12
Tableau 6.	Organisation de la transformation par biolistique avec les CRISPR.	15
Tableau 7.	Organisation de la transformation par biolistique avec les TALEN®.	15
Tableau 8.	Influence de la forme de la matrice sur l'efficacité de transformation.	16
Tableau 9.	Influence du nombre de tirs sur l'efficacité de transformation.	16
Tableau 10.	Influence de la puissance de tir sur l'efficacité de transformation.	16
Tableau 11.	Influence de la date de transfert sur milieu sélectif sur l'efficacité de transformation.	16
Tableau 12.	Plantules transformées par <i>NptII</i> ayant pris racine sur milieu sélectif de racinement.	17
Tableau 13.	Plantules négatives en PCR <i>NptII</i> ayant pris racine sur milieu sélectif de racinement.	17
Tableau 14.	Plantules transformées par <i>NptII</i> ayant aussi intégré la FokI.....	17
Tableau 15.	Récapitulatif des paramètres de biolistique pour les 5 plantules modifiées.	18
Tableau 16.	Organisation de la biolistique avec les TALEN® linéarisés.....	20

LISTE DES ANNEXES

Annexe I.	Carte plasmidique du pCLS24222	Erreur ! Signet non défini.
Annexe II.	Carte plasmidique du pCAMBIA-T2A.....	2
Annexe III.	Carte plasmidique du pBGWD0 <i>NptII</i> Intron eIF4E GFP	3
Annexe IV.	Composition du milieu de digestion GSG	4
Annexe V.	Composition du milieu de lavage KCl/CaCl ₂	4
Annexe VI.	Composition du milieu de lavage MKCl.....	5
Annexe VII.	Composition du milieu de culture protoplaste NT1	5
Annexe VIII.	Composition du milieu de germination.....	6
Annexe IX.	Composition du milieu plasmolysant	6
Annexe X.	Composition du milieu de co-culture	7
Annexe XI.	Composition du milieu de régénération	8
Annexe XII.	Composition du milieu d'enracinement.....	9
Annexe XIII.	Composition du tampon de lyse pour l'extraction d'ADNg.....	10

I. INTRODUCTION

A. Le projet GENIUS

Dans un contexte de changement climatique et d'accroissement de la demande alimentaire, l'agriculture mondiale a une importance particulière. Alors qu'un nombre grandissant de pays agricoles majeurs fait appel à la transgénèse pour élargir le réservoir de gènes disponibles, la France et certains pays européens se limitent à la seule sélection après croisements ou mutations aléatoires. En effet, la mutagénèse est moins coûteuse que la transgénèse, peut se faire directement sur des génotypes élites et surtout elle n'est pas soumise à la réglementation OGM. Mais elle a ses limites car elle nécessite le criblage de larges populations de mutants, les mutations induites se font de manière aléatoire et il n'est pas toujours possible d'obtenir les mutants souhaités.

Complémentaire aux techniques classiques de sélection, la transgénèse est une technologie importante pour rester compétitif au niveau mondial, en plus d'être un outil indispensable en recherche fondamentale pour l'établissement formel du lien entre séquence et fonction. Les techniques de transgénèse utilisées jusque dans les années 2010 ne permettaient pas de maîtriser l'insertion du transgène dans le génome, qui se faisait au hasard et avec la possibilité de causer des effets indésirables voire létaux pour l'organisme ciblé ou d'être localisés dans des régions réprimées pour leur expression. De nouvelles méthodes de transgénèse ciblée permettent désormais de modifier le génome végétal avec une très grande précision, grâce à l'utilisation d'enzymes capable de réaliser des coupures de l'ADN à des endroits prédéfinis : les "Site Directed Nucleases" (SDN). Il est alors possible de muter des gènes pour qu'ils ne soient plus exprimés, mais aussi de les modifier de façon précise. Cela pourrait permettre de créer de nouveaux allèles en exploitant la diversité génétique, ou même ou de reproduire des allèles existants chez d'autres espèces éloignées. Chez la tomate par exemple, de tels outils pourraient permettre de gagner en diversité. En effet, la diversité génétique des espèces sauvages apparentées est très large mais moins de 5% de cette diversité se retrouve chez les génotypes cultivés (Bai & Lindhout, 2007).

Le développement de nouvelles technologies est donc important pour soutenir la compétitivité des semenciers. La démonstration de leur applicabilité et de leur intérêt chez un grand nombre d'espèces végétales cultivées constitue l'objectif central du projet "Investissements d'Avenir" GENIUS (Genome ENgineering Improvement for Useful plants of a Sustainable agriculture). La finalité du projet GENIUS est de fournir aux scientifiques et sélectionneurs français un savoir-faire de pointe, le matériel biologique et la propriété intellectuelle associés, et à terme devrait ouvrir la voie pour une génomique fonctionnelle à haut débit et une sélection variétale plus efficace (Projet GENIUS, 2015). Les technologies développées dans ce projet devraient permettre d'accélérer l'obtention de variétés répondant aux critères de sélection avec une meilleure précision. Le projet GENIUS vise à développer les technologies de ciblage du génome chez neuf espèces cultivées : blé, maïs, riz, colza, tomate, pomme de terre, peuplier, pommier et rosier.

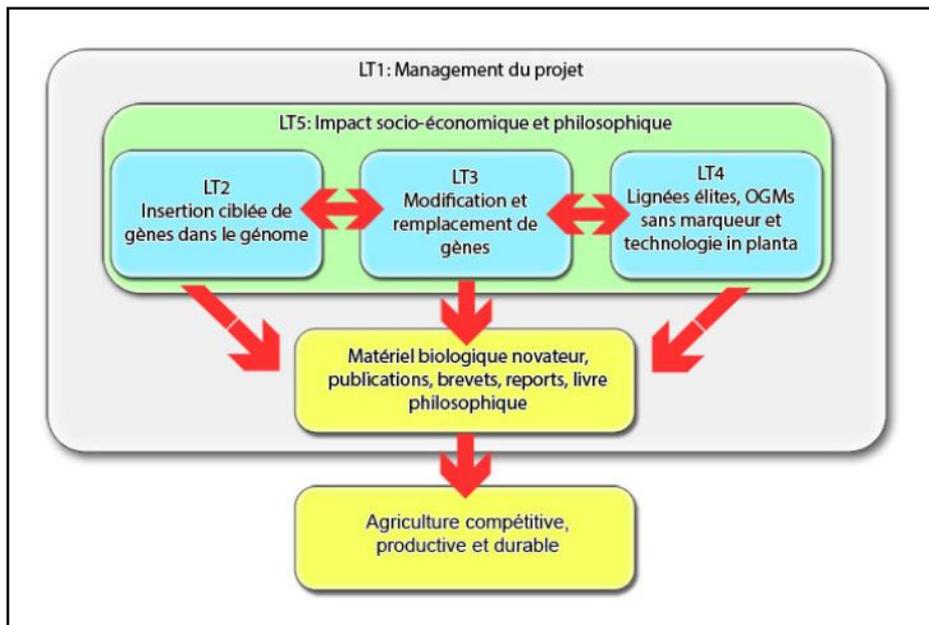


Figure 1. Lots de travaux (LT) du projet GENIUS.

Les différents lots de travaux définis dans le projet GENIUS sont : LT 1 gestion du projet et suivi des travaux ; LT2 utilisation des méganucléases, TALEN® et CRISPR pour l'insertion ciblée de gènes au niveau de « landing-pads » ; LT3 modification ciblée de gènes par des microARN artificiels, méganucléases, TALEN® et CRISPR ; LT4 développement de méthodes de transformation efficace des génotypes commerciaux ; LT 5 études réglementaires, économiques et philosophiques pour l'exploration du cadre socio-économique du travail expérimental. Source : GENIUS, 2015.

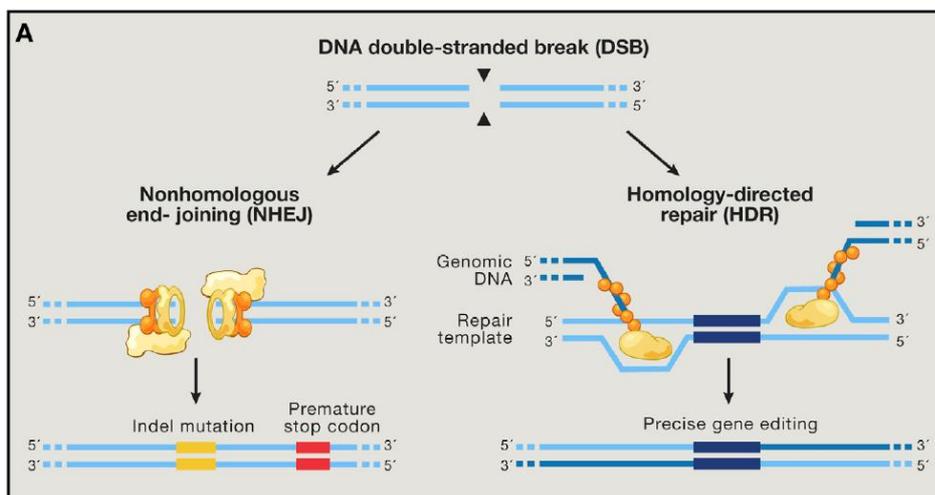


Figure 2. Deux voies de réparation des coupures double brin : NHEJ et HDR.

Lorsque l'ADN subi une cassure double brin, il peut être réparé selon deux processus distincts. La voie majoritaire est le Non Homologous End Joining (NHEJ) qui entraîne souvent une réparation imparfaite de l'ADN et des mutations de type Indel. L'Homology Directed Repair (HDR) permet de réparer l'ADN en utilisant le brin d'ADN sœur intact comme modèle, ce qui donne lieu à une réparation parfaite de la séquence. Source: Hsu et al., 2014.

Les travaux réalisés lors de ce stage font partie intégrante du lot de travail 3 de GENIUS : la mise en place de méthodes efficaces pour la modification ciblée de gènes (figure 1), ainsi que l'utilisation de ces techniques pour générer de nouveaux caractères chez la tomate *Solanum Lycopersicum*.

B. Les outils de ciblage du génome

Depuis quelques années, de nouveaux outils de ciblage du génome ont été développés qui provoquent des cassures d'ADN double brin de façon ciblée dans le génome. Les coupures double brin de l'ADN peuvent être létales pour les cellules si elles ne sont pas réparées. Deux voies de réparation peuvent intervenir dans les cellules (figure 2; Waterworth et al., 2011; Fauser et al., 2012; Voytas, 2013; Puchta et al., 2014; Hsu et al., 2014). Par Non Homologous End Joining (NHEJ), les brins complémentaires sont recoupés et réalignés sur des micro-homologies, entraînant souvent une réparation imparfaite de l'ADN avec des mutations de type insertion/délétion (Indel). Il s'agit de la voie de réparation prédominante pour les organismes supérieurs tels que les végétaux et les animaux. Par Homology Directed Repair (HDR) au contraire, les brins d'ADN encadrant la cassure sont recoupés et le brin d'ADN est réparé par homologie de séquence avec le brin d'ADN sœur. L'ADN ainsi restauré a une séquence identique à l'ADN utilisé comme matrice (Mazón et al., 2010; Waterworth et al., 2011).

Ce processus peut être orienté vers la voie HDR si une matrice de remplacement est apportée, à condition de posséder une homologie suffisante de part et d'autre du site de coupure double brin (Li et al., 2013; Shan et al., 2013; Schiml et al., 2014; Bortesi & Fischer, 2014). En effet, la cassure induite par la nucléase peut être parfaitement réparée par recombinaison homologue en utilisant l'ADN exogène comme matrice pour la réparation. Cette stratégie est plus complexe que l'induction d'une mutation de type Indel car la matrice de remplacement doit être présente dans la cellule au moment de la coupure double brin par la nucléase.

Un des premiers outils de ciblage du génome exploités au laboratoire, les méganucléases ont été découvertes dans les années 1970 chez la levure (Stoddard, 2011) et réalisent naturellement des coupures double brin de façon ciblée. Les méganucléases utilisées pour le ciblage de gènes appartiennent principalement à la famille des LAGLIDADG Homing Endonuclease. Codées par des introns mobiles, elles possèdent un site de reconnaissance de l'ADN très spécifique, ainsi qu'un domaine catalytique permettant le clivage de l'ADN en un site précis (Sce-I ou Rag-I par exemple). Cependant, la production de méganucléases modifiées est complexe et peu flexible ce qui limite leur intérêt.

Parmi les premières à avoir été utilisées, les nucléases à doigts de zinc (ou ZFN pour Zinc Finger Nuclease)(Kim et al., 1996; Bibikova et al., 2001) ont été créées artificiellement grâce à la fusion de plusieurs motifs type doigt de zinc avec le domaine catalytique de l'enzyme de restriction de type II FokI (ou endonucléase). Les doigts de zinc spécifient le motif de liaison à l'ADN, tandis que la dimérisation de deux domaines catalytiques foki, nécessaire pour obtenir le clivage de l'ADN, provoque la cassure d'ADN double-brin en un point précis (figure 3).

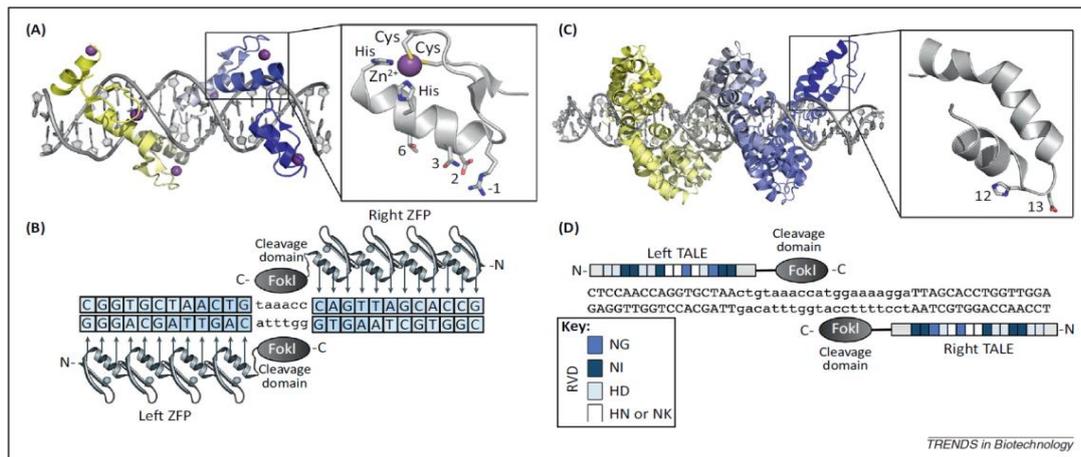


Figure 3. Structure des ZFN et TALEN® et spécificité de reconnaissance.

A) Interaction entre des motifs type doigts de zinc (ZF) avec l'ADN. Chaque doigt de zinc est constitué de 30 acides aminés. Les acides aminés en position 1, 2, 3 et 6 permettent la fixation à l'ADN. B) Paire de ZFN constituée de 4 motifs doigt de zinc fusionnés en N-ter avec la nucléase FokI sur son site de reconnaissance à l'ADN. C) Interaction entre un TALE et l'ADN. En encadré, représentation d'un motif répété soit 33-35 acides aminés dont les RVD (acides aminés 12 et 13) qui spécifient le nucléotide reconnu. D) Représentation d'un couple de TALEN® fixés à l'ADN. Le nucléotide A est reconnu par NI (Asparagine et Isoleucine), C par HD (Histidine et asparagine), T par NG (Asparagine et Glycine) et enfin G par NN (Asparagine et asparagine) ou NK (Asparagine Lysine). Source : (Gaj et al., 2013).

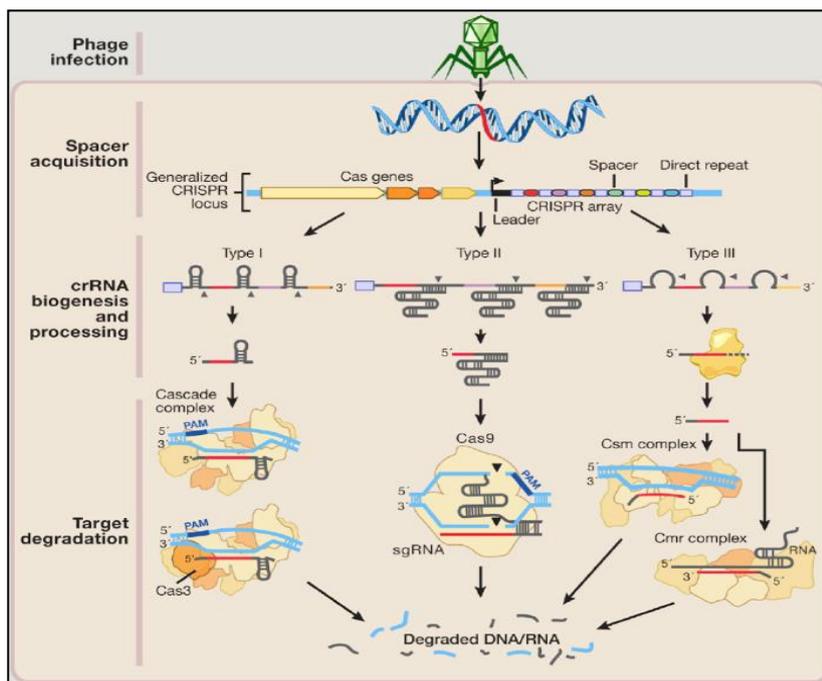


Figure 4. Immunité adaptative médiée par CRISPR/Cas9 chez les bactéries.

A la suite d'une infection par un phage, l'ADN étranger est intégré dans le génome au niveau du locus CRISPR et réparti entre les répétitions (Spacer acquisition). Trois systèmes de défense peuvent alors être activés. Dans les types I et III, le transcrite CRISPR est clivé au niveau des répétitions par des ribonucléases associées et permet la reconnaissance et le clivage de la cible par la Cas3 (type I) ou le complexe Cmr ou Csm (type III). Dans le système de type II, le tracrRNA se fixe au transcrite CRISPR avant d'être clivé par des nucléases endogènes. Le duplex ARN ainsi formé forme alors un complexe avec la Cas9 pour cliver l'ADN cible. Source : Hsu et al., 2014.

Cependant, les ZFN ont une spécificité limitée en terme de séquence reconnue et les risques de coupure ailleurs sur le génome sont élevés (Voytas, 2013), ce qui peut entraîner des effets secondaires peu appréciables.

Plus récemment, les domaines de reconnaissance de l'ADN issus de TALE (Transcription activator like effector) ont été fusionnés en C-terminal avec le domaine catalytique de la nucléase FokI pour donner les TALEN® (de Lange et al., 2014). Ces TALE ont été découverts chez une bactérie du genre *Xanthomonas*, qui les injecte dans les cellules des plantes hôtes grâce à un système de sécrétion de type III. Les TALE pénètrent ensuite dans le noyau pour se lier et activer spécifiquement des gènes facilitant la colonisation bactérienne (Bogdanove et al., 2010). Chaque TALE est constitué d'un domaine N-terminal contenant un signal de translocation au cytoplasme, d'un domaine central de liaison à l'ADN, et de signaux de localisation nucléaire et d'un domaine d'activation de la transcription en C-terminal. Le domaine de liaison à l'ADN est constitué de répétitions en tandem d'un même motif composé de 34 acides aminés. La séquence de chaque répétition est identique sauf pour les acides aminés 12 et 13, appelés Repeat Variable Di-residues (RVD, figure 3), qui déterminent le nucléotide reconnu par la répétition et donc la spécificité de fixation. La correspondance entre le RVD et le nucléotide reconnu a été élucidée par Moscou et al. en 2009. Ainsi, il est possible en modifiant quelques acides aminés de créer des TALE reconnaissant des séquences spécifiques d'ADN, et d'obtenir leur clivage suite à la dimérisation des domaines catalytiques de la nucléase FokI qui leur sont fusionnés. Plusieurs entreprises se sont déjà lancées dans le développement et la commercialisation de TALEN® à façon (Collectis Bioresearch, France; Transposagen Biopharmaceuticals, USA; Life Technologies, USA)(Gaj et al., 2013). Les TALEN® ont déjà fait leurs preuves chez les plantes puisqu'ils ont été utilisés pour réduire la production d'acrylamide chez la pomme de terre (Clasen et al., 2015). Il a aussi été montré que les modifications induites par les TALEN® se transmettent à la descendance (Lor et al., 2014; Char et al., 2015).

Enfin, ces dernières années, le système CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9) a été mis au point et a déjà été utilisé avec succès dans de nombreux organismes. Les CRISPR ont été découverts chez *Escherichia coli* en 1987, sous forme de courtes séquences répétées en tandem et séparées par des séquences spacer (Wei et al., 2013; Belhaj et al., 2015), mais le rôle de ces régions dans l'immunité adaptative bactérienne n'a été démontré que 20 ans plus tard. Les séquences spacer (aussi appelées protospacer) proviennent de sources exogènes, et permettent de spécifier la cible de l'endonucléase Cas9. Le spacer forme un complexe avec deux courtes molécules d'ARN : le crRNA (CRISPR RNA) et le tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA) pour cliver l'ADN 3 nucléotides avant un motif PAM (Protospacer Adjacent Motif, -NGG-)(figure 4). Des trois systèmes de défense bactériens d'interférence, celui de type II a été adapté pour être exploité au laboratoire (Jinek et al., 2012; Mali et al., 2013). Artificiellement, un ARN chimérique résultant de la fusion du crRNA et du tracrRNA a été obtenu et appelé sgRNA pour single guide RNA (figure 5). Dès lors, il devient très simple de synthétiser des CRISPR puisqu'il suffit de modifier une vingtaine de nucléotides de cet

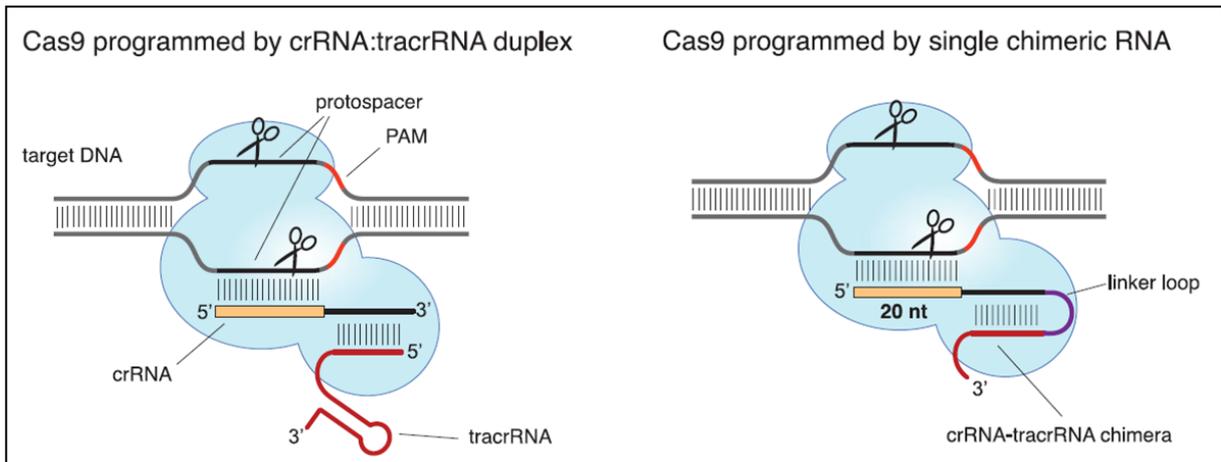


Figure 5. Fusion du crRNA et du tracrRNA pour former un unique ARN chimérique sgRNA.

A gauche, reconnaissance d'une cible par le complexe formé par le duplex tracrRNA-crRNA associés à la Cas9. A droite, un ARN chimérique résultant de la fusion du crRNA et du tracrRNA a été obtenu artificiellement et appelé sgRNA pour single guide RNA Source : Jinek et al., 2012.

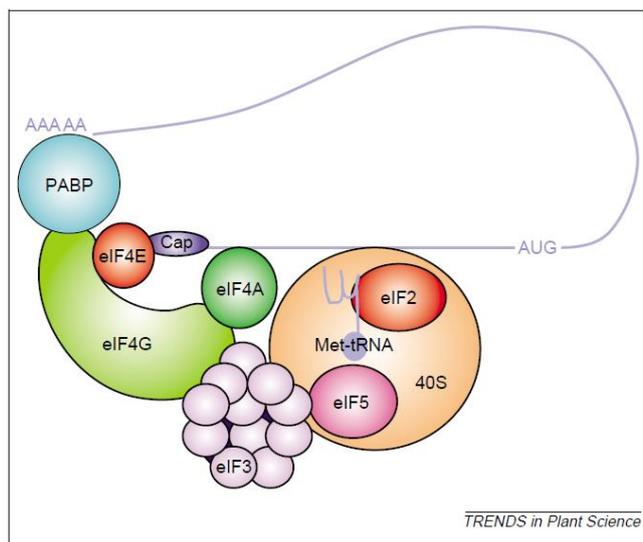


Figure 6. Organisation du complexe d'initiation de la traduction eucaryote.

Les ARN messagers (ARNm) matures (comportant la coiffe en 5') sont recrutés par le complexe eIF4F, qui est composé des deux sous-unités eIF4E et eIF4G. eIF4E se fixe à la coiffe tandis que eIF4G a un rôle d'échafaudage et interagit avec les autres facteurs d'initiation de la traduction polyA Binding Protein (PABP), eIF4A et eIF3 qui se lie avec la sous-unité 40S du ribosome. Source : Robaglia and Caranta, 2006.

ARN chimérique pour spécifier la cible ADN, à condition de s'assurer qu'un site PAM soit adjacent au site cible. De plus, étant donné la petite taille du guide ARN, il est possible de cibler plusieurs gènes simultanément (Li et al., 2013; Cong et al., 2013; Y. Wang et al., 2014). Le système CRISPR/Cas9 a connu un essor important en quelques années et il a déjà été appliqué avec succès à de nombreuses plantes modèles (Feng et al., 2013; Schiml et al., 2014; Belhaj et al., 2015) y compris chez la tomate (Brooks et al., 2014).

La réalisation des objectifs du projet GENIUS passe par l'utilisation d'outils adaptés au ciblage précis du génome tels que décrits précédemment. Leur mise en œuvre chez la tomate a été possible car la transformation et la régénération de plantes à partir d'explants sont bien maîtrisées au sein de l'équipe ReV (Résistance aux Virus) et la séquence du génome de la tomate a été élucidée (The Tomato Consortium Genome, 2012). La preuve de l'efficacité puis de l'utilité de ces outils passe par le ciblage de gènes donnant lieu à un phénotype directement visible, jusqu'à des gènes ayant un intérêt agronomique et en sélection tels les gènes de résistance aux virus.

C. eIF4E et résistance aux virus

L'équipe ReV de l'unité de recherche GAFL (Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes) de l'INRA d'Avignon participe au projet GENIUS. Cette équipe étudie les bases génétiques et moléculaires de la résistance aux virus dans les plantes, et principalement les facteurs de l'hôte requis pour le cycle infectieux viral, avec pour objectif l'identification de nouvelles cibles pour la résistance virale. Cette équipe cherche aussi à développer des outils biotechnologiques pour générer de nouvelles résistances dans les plantes en tirant parti de l'exploration de la diversité naturelle quand elle existe. Un autre sujet de préoccupation est aussi d'élargir le spectre de résistance ou de générer des systèmes de résistance durable.

En collaboration avec d'autres partenaires, l'équipe ReV a mis en évidence le rôle du facteur d'initiation de la traduction eIF4E dans la résistance récessive aux potyvirus (Robaglia & Caranta, 2006; Mazier et al., 2011). Ce gène fait partie d'une petite famille multigénique composée de trois gènes chez la tomate : *eIF4E1*, *eIF4E2* et *eIF(iso)4E*. Une fois traduite, la protéine eIF4E reconnaît et se lie à la coiffe en 5' de l'ARNm ainsi qu'à eIF4G pour former le complexe eIF4F (figure 6). Ce complexe peut ensuite recruter d'autres facteurs d'initiation de la traduction et la sous-unité 40S du ribosome pour initier la traduction (Browning, 2004; Robaglia & Caranta, 2006). eIF4E a été identifiée comme impliquée dans la résistance récessive par clonage et séquençage, suivi d'une validation fonctionnelle par complémentation. Des tests de double-hybride (Wittmann et al., 1997) ont mis en évidence l'interaction physique entre eIF4E et la protéine virale VPg (Viral genome-linked Protein) de plusieurs virus faisant partie des potyvirus (Piron et al., 2010). Les potyvirus représentent le plus large groupe de virus de plantes et beaucoup d'entre eux ont un impact au niveau agronomique. Le génome des potyvirus est un ARN simple brin à polarité positive d'environ 10 kb (A. Wang & Krishnaswamy, 2012), polyadénylé en 3' et lié de façon covalente à la protéine virale VPg en 5' (Charron et al., 2008).

De nombreux allèles naturels de résistance de *eIF4E* ont été identifiés chez le piment (Sandrine Ruffel et al., 2002; Charron et al., 2008), mais très peu sont disponibles chez la tomate (S Ruffel et al., 2005). Des études comparatives menées sur le piment, la laitue, le pois et la tomate ont mis en évidence des mutations non synonymes impliquées dans la résistance récessive aux potyvirus. Elles sont situées dans deux régions particulières de *eIF4E* (figure 7). Chez beaucoup de plantes dont la tomate, ces deux régions sont localisées au niveau des exons 1 et 2 du gène *eIF4E*.

Etant donné la faible diversité des ressources génétiques de la tomate pour la résistance aux potyvirus, il serait intéressant d'employer les outils de ciblage génique décrits précédemment pour créer de la variabilité pour la résistance aux virus et approfondir les connaissances concernant le rôle précis de *eIF4E* dans l'interaction plante/virus. Ces outils permettraient ainsi de remplacer l'allèle sensible de *eIF4E* par différentes versions élaborées en fonction des données obtenues pour le piment, chez lequel la diversité génétique pour la résistance à différents potyvirus est plus large. En plus de l'intérêt de ces recherches pour l'obtention de résistances nouvelles aux virus et pour l'amélioration de la tomate, l'obtention de génotypes de tomate résistants aux potyvirus (premiers prototypes) par ciblage génique constituera une preuve de concept importante pour le projet GENIUS.

D. Objectifs

Lors de ce stage, l'objectif principal était de mettre en œuvre deux outils de ciblage du génome chez la tomate sur le gène *eIF4E* : les TALEN[®] et les CRISPR. Le but à terme serait l'obtention de preuves de concept. Une première étape incontournable pour maîtriser ces outils est de réussir à réaliser des coupures double brin au niveau du gène ciblé *eIF4E*, indispensable au cycle viral et donc impliqué dans la résistance chez la tomate. Dans un deuxième temps, dans le but d'obtenir des allèles de *eIF4E* pouvant potentiellement conférer un spectre de résistance aux potyvirus plus ou moins large, il faudrait apporter au moment de la cassure d'ADN une matrice de remplacement portant les modifications souhaitées (quelques nucléotides au niveau du gène ciblé). Cela permettrait de montrer qu'il est possible de modifier à façon un génome grâce à ces outils.

A mon arrivée, les plasmides de base contenant chaque TALEN[®] étaient disponibles et la preuve de coupure avait déjà été réalisée en expression transitoire en protoplastes. Il restait donc à reproduire l'expérience en transformation stable par *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*), et essayer d'obtenir un remplacement d'allèle par biolistique. Une matrice de remplacement avait déjà été synthétisée au laboratoire dans ce but. La technique de biolistique avait été testée une fois l'année précédente et semblait prometteuse, à condition de réaliser quelques optimisations techniques et de montrer l'insertion stable de transgène de façon reproductible.

Le deuxième outil à mettre en œuvre chez la tomate, les CRISPR, n'avaient encore jamais été utilisés. Tout était à faire depuis l'analyse *in silico* des cibles et la définition des ARN guides jusqu'à la preuve de coupure, et à terme la modification d'allèle. Le but était donc de construire les plasmides permettant l'expression des CRISPR, et d'obtenir la preuve de la coupure en expression transitoire et/ou en transformation stable par *A. tumefaciens* ou biolistique.

Tableau 1. Récapitulatif des constructions à disposition

Construction	Détails	Résistance bactérie/plante	Source
TALEN			
pCLS24222	TALEN gauche NS1	Amp/	Collectis
pCLS24224	TALEN droit NS1	Amp/	Collectis
pCLS24226	TALEN gauche NS1	Amp/	Collectis
pCLS24228	TALEN droit NS1	Amp/	Collectis
pCLS23954	TALEN gauche NS2	Amp/	Collectis
pCLS23956	TALEN droit NS2	Amp/	Collectis
pCAMBIA5300-T2A	Plasmide binaire contenant le signal T2A	Spect/Hygro	Partenaire P8
CRISPR			
pDONR	Vecteur donneur	Zéocine /	Laboratoire
pEn-Chimera	Vecteur d'entrée	Amp/	Fauser et al., 2014
gBlock proU3-protospacer4-sgRNA	Séquence de l'ARN guide ciblant l'exon 2 encadrée attB1/2	-	Synthèse IDT
gBlock proU3-protospacer5-sgRNA	Séquence de l'ARN guide ciblant le début de l'intron encadrée attB1/2	-	Synthèse IDT
gBlock proU3-protospacer6-sgRNA	Séquence de l'ARN guide ciblant la fin de l'intron encadrée attB1/2	-	Synthèse IDT
pUBICas9	Cas9 optimisée pour <i>A. thaliana</i>	Amp /	F. Nogué (INRA Versailles)
Matrice			
pBGWDO NptII Intron eIF4E GFP	Matrice de remplacement avec GFP	Amp/Kana	Laboratoire
pUC57 Kana Intron eIF4E	Matrice de remplacement version pep1 P39T	Amp/Kana	Synthèse GenScript

Amp: ampicilline; Spect: spectinomycine; Hygro: hygromycine; Kana: kanamycine; NS1: site 1; NS2: site 2.

Pour le remplacement d'allèle, la première matrice synthétisée n'était pas adaptée pour les CRISPR, puisque les sites de reconnaissance des CRISPR sur le gène ciblé *eIF4E* existent aussi sur cette matrice. Il a donc été nécessaire de la modifier pour éliminer les sites de reconnaissance tout en concevant de nouvelles matrices de remplacement correspondant à différentes versions de gènes *eIF4E* modifiés.

II. MATERIEL ET METHODES

MATERIEL

A. Matériel végétal

Le génotype de tomate utilisé est WVA106 (West Virginia 106), choisi pour sa bonne aptitude à la régénération. Il s'agit d'un cultivar de tomate type cerise dont les graines sont multipliées à unité GAFL. Des plantes WVA106 transformées par *A. tumefaciens* avec la construction contenant la séquence codante complète du gène *eIF4E*, modifiée au niveau du site de reconnaissance TALEN® avec l'insertion du gène *Neomycine transferase II (NptII)*, ont été utilisées comme témoins positifs pour certaines analyses moléculaires.

B. Souches bactériennes

Pour les clonages, les bactéries utilisées pour la transformation sont des *Escherichia coli (E. coli)* DH10B électrocompétentes. Pour la transformation de plantes, les bactéries utilisées sont des *A. tumefaciens* C58 pGV2260 portant une résistance à la rifampicine comme marqueur chromosomique. Elle dérive de la souche sauvage C58 par remplacement du plasmide pTiC58 par le plasmide pTi de la souche à octopine pTiB6806 dont l'ADN-T a été remplacé par le gène de résistance à l'ampicilline.

C. Constructions plasmidiques

TALEN®

Dans le cadre du projet GENIUS, les TALEN® sous le contrôle d'un promoteur constitutif CaMV35S (Cauliflower Mosaic Virus) et d'un terminateur NOS (Nopaline Synthase) ont été synthétisés par le partenaire Collectis et livrés dans des plasmides pCLS contenant le gène de résistance à l'ampicilline (annexe I). Chaque TALEN® est composé d'un signal de localisation nucléaire (NLS), d'un domaine N-terminal suivi des motifs répétés qui constituent le domaine de reconnaissance de l'ADN, d'un domaine C-terminal et de la nucléase FokI. Deux paires de TALEN® ciblent le début de l'intron : pCLS24222/pCLS24224 et pCLS24226/pCLS24228, et une paire cible la fin de l'intron : pCLS23954/pCLS23956 (tableau 1). Les sites de reconnaissance des deux premières paires sur le site 1 sont décalés d'une dizaine de nucléotides et ont donc une partie commune (figure 8). Chaque paire de TALEN® a été introduite dans un vecteur binaire pCAMBIA5300-T2A réalisé par le partenaire P8 de GENIUS (annexe II), conçu pour la transformation des TALEN® par *A. tumefaciens*.

CRISPR

Des couples d'amorces correspondant aux protospacers ciblant l'exon 1 (2 couples) et l'exon 2 (1 couple) étaient disponibles à mon arrivée, ainsi que le plasmide d'entrée pEn-Chimera qui contient la séquence du promoteur U6 séparé du sgRNA par 2 sites *BbsI*, ainsi que la résistance à l'ampicilline. Par la suite, des fragments d'ADN ont été synthétisés par la société IDT, correspondant aux ARN guides sous le contrôle du promoteur U3 ou U6, encadrés par des sites Gateway attB1 et 2. Un pDONR/Zeo était aussi disponible pour les réactions Gateway portant la résistance à la zéocine. Le pUBI-Cas9-1E utilisé pour l'électroporation et la biolistique contient la Cas9 optimisée pour *A. thaliana* sous le contrôle du promoteur constitutif de l'ubiquitine et d'un terminateur CaMV35S. Ce plasmide nous a été fourni par F. Nogué (INRA de Versailles).

Matrice de remplacement

La matrice de remplacement pUC57-Kana-Intron-*eIF4E* correspond à une région d'homologie 5' de 418 pb avec le promoteur et le début de l'exon 1 du gène *eIF4E*, la mutation de CCT en ACA (qui correspond à la modification *pep1*), puis le gène *NptII* et une deuxième région d'homologie 3' avec l'intron de 468 pb (figure 9). Le site de reconnaissance TALEN[®] est interrompu par l'insertion du gène *NptII* conférant la résistance à la kanamycine. Le gène *NptII* est encadré par des sites *RagI* (méganucléase) pour pouvoir l'exciser par la suite. Cette séquence se trouve dans un plasmide pUC57 comportant une cassette de résistance à l'ampicilline. Une seconde version de la matrice de remplacement, pBGWD0-*NptII*-intron-*eIF4E*-GFP (annexe III), contient la séquence précédente suivie du gène de la GFP sous le contrôle du promoteur roID et d'un terminateur 35S, le tout inséré dans un vecteur binaire.

METHODES

A. Préparation des semis

Les graines ont été stérilisées 30 minutes dans une solution désinfectante (Inovchlore 5 g/ 800 mL, additionné de 500 µL de Teepol). Pour leur germination, les graines sont placées stérilement en boîte de Petri ou bocal sur milieu de germination (annexe VIII) pendant 24 à 48 heures à l'obscurité. La culture des plantes ainsi que leur régénération a eu lieu en chambre de culture avec un rayonnement actif pour la photosynthèse de 260 µmol/m²/s, une photopériode de 8h de nuit à 16°C, 16h de jour à 20°C à une humidité relative de 50%.

B. Transgénèse

Toutes les manipulations ont été réalisées en conditions stériles, sous hotte à flux laminaire et avec du matériel stérile.

1. Transformation transitoire en protoplastes

Des feuilles ont été prélevées sur des plantes stériles de 4 semaines cultivées en chambre de culture puis digérées dans 10 ml de milieu de digestion GSG (annexe IV) additionné de cellulase à 4,8mg/mL, macerozyme à 2,2mg/mL et MES (acide 2-N-MorpholinoEthaneSulfonique) à 7mM.

Les feuilles ont été lacérées à l'aide d'un scalpel stérile pour permettre une meilleure digestion. Les boîtes ont ensuite été placées à l'obscurité et sous agitation à 40 rpm pendant 18h. La suspension de protoplastes a ensuite été filtrée sur tamis en acier de 71 μm pour éliminer les débris végétaux et récupérée dans des tubes en verre stériles. La suspension a été centrifugée 10 minutes à 36 g après quoi le surnageant a été éliminé. Le culot a ensuite été resuspendu par agitation manuelle douce dans le fond du surnageant, puis 20 ml de milieu KCl/CaCl₂ (annexe V) ont été ajoutés. Deux lavages par le KCl/CaCl₂ ont été réalisés ainsi, suivis de deux lavages par du milieu MKCl (annexe VI). La concentration en protoplastes a été calculée sur cellule de Malassez et ajustée à $2 \cdot 10^6$ protoplastes/mL. La conductivité de la suspension de protoplastes ainsi obtenue a été ajustée à 3000 $\mu\text{S/cm}$ avec du KCl 1 M. Les électroporations ont été réalisées dans des cuves de 1 cm de côté avec 15 pmol de chaque construction, 20 pmol de plasmide Cas9 et de l'ADN carrier à 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (sperme de saumon) à un ratio de 1 : 2 μg d'ADN total. Le mélange d'ADN a été ajouté à 1 mL de la suspension de protoplastes. L'électroporation a été réalisée avec 4 à 5 impulsions à une tension de 250 V et à une capacité de 100 μF à l'aide d'un électroporateur fabriqué par P. Guerche (IJPB - INRA Versailles). Les protoplastes électroporés ont ensuite été transférés en boîte de repiquage contenant 9 ml de milieu NT1 (annexe VII) contenant de l'ANA (Acide NaphtalèneAcétique) à 1,1 mg/L, du BAP (6-BenzylAminoPurine) à 0,6 mg/L et du 2-4D (acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique) à 0,6 mg/L. Les boîtes ont ensuite été placées à l'obscurité dans un phytotron à une hygrométrie de 80%. Après 72h, les suspensions de protoplastes ont été centrifugées 10 min à 36 g et les culots de protoplastes ont été récupérés en tube eppendorf. L'ADN issu des protoplastes a été extrait pour être analysé au niveau moléculaire.

2. Transformation stable

Biolistique

Des feuilles entières ont été prélevées sur des plantes stériles âgées de 3 à 4 semaines, déposées en rond de 5 cm de diamètre au centre de boîte de Petri contenant du milieu plasmolysant (annexe IX) et incubées pendant 2h à l'obscurité. Un volume correspondant à 1 μg de chaque ADN à bombarder a été ajouté à 20 μL de billes d'or de 0,6 μm de diamètre (BIO-RAD) et vortexés. Un mélange de 50 μL de CaCl₂ à 2,5 M et 20 μL de spermidine à 0,1 M a été ajouté aux billes et ADN, puis le tout a été vortexé pendant 5 minutes. Après centrifugation, le culot a été lavé avec 100 μL d'éthanol 100%, puis repris dans 100 μL (pour les TALEN[®]) ou 80 μL (pour les CRISPR) d'éthanol 100% et maintenu dans la glace jusqu'aux tirs. Chaque tube de billes préparé a permis de réaliser 10 tirs à raison de 10 μL par tir, avec des disques de rupture de 900 et 1100 PSI. Le bombardement des feuilles a été réalisé avec le canon Dupond PDS 1000/He biolistic gene gun[®] (BIO-RAD). Une fois les tirs réalisés, les boîtes de feuilles ont été placées à l'obscurité pendant 12h, avant d'être transférées sur milieu de co-culture (annexe X) et remises à l'obscurité pendant 3 jours. Les feuilles ont alors été découpées en explants d'environ 5 mm² de surface et remises sur milieu de co-culture à l'obscurité pendant 24h, 48h ou 72h. Les explants ont ensuite été transférés sur milieu de régénération (annexe XI) contenant de la kanamycine à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ comme agent de sélection.

Pour la première expérience de biolistique (plasmides TALEN®, matrice linéarisée ou non), toutes les plantules régénérantes ont été analysées systématiquement pour avoir une vision d'ensemble sur la technique de biolistique. Pour les expériences suivantes seules les plantules racinant sur milieu d'enracinement ont été analysées.

Une expérience de biolistique a aussi été réalisée avec les CRISPR, en reprenant cette fois les billes dans 80µL d'éthanol 100% et en réalisant 8 tirs par combinaison. Les 8 tirs ont été réalisés à partir de 1 µg de chaque plasmide CRISPR et de la matrice de remplacement, et de 2 µg du plasmide contenant la Cas9.

Transformation via *A. tumefaciens*

Chaque souche d'*A. tumefaciens* a été mise en suspension dans 20 mL de milieu LB additionné de rifampicine 50 mg/L, d'ampicilline 50 mg/L et de spectinomycine 75 mg/L. Le tout a été incubé à l'obscurité à 140 rpm et 28°C. Trois suspensions bactériennes ont ainsi été réalisées. Après 24h, la concentration des agrobactéries a été évaluée à partir de la densité optique (DO) mesurée à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Un volume calculé de culture a ensuite été transféré en tube Falcon pour obtenir un volume final de 30 mL avec une DO de 0,3. Le tout a été centrifugé à 5000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le culot a ensuite été repris dans 30 mL de milieu de co-culture liquide et sa DO vérifiée. Un volume de 10 mL de la suspension bactérienne correspondant au couple 954-956 a été mélangé avec 10 mL de suspension de bactéries transformées avec le couple 222-224 ou 226-228. Le mélange ainsi obtenu a été versé sur des feuilles issues de plantes âgées de 3 à 4 semaines et des cotylédons prélevés sur plantules de 10 jours préalablement découpés et placés sur milieu de co-culture. Après 20 minutes, le surplus de suspension bactérienne a été éliminé et les boîtes ont été mises à l'obscurité en chambre de culture. Après 48 heures, les explants ont été transférés face inférieure au contact du milieu de régénération contenant de l'hygromycine comme agent de sélection à raison de 15 explants par boîte et replacés en chambre de culture.

Régénération des plantules

Les explants ont été repiqués tous les 15 jours jusqu'à régénération de plantules, qui ont été isolées sur milieu de racinement (composition en annexe XII) alors que les explants d'origine ont été individualisés sur milieu de régénération. Les plantules prenant racine sur milieu d'enracinement ont ensuite été transférées en tube contenant du milieu d'enracinement puis acclimatées en serre. La moitié des témoins réalisés ont été repiqués sur milieu sélectif comme les explants générés lors des transformations, et l'autre moitié a été repiquée sur les milieux sans agents de sélection pour vérifier et suivre la régénération.

3. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN issu des plantules régénérantes et des protoplastes a été extrait selon le protocole adapté de Fulton et al., 1995. Deux à trois jeunes feuilles ont été congelées en tube dans de l'azote liquide et broyées au micropilon.

Tableau 2. Amorces utilisées pour l'analyse moléculaire des plantes.

Amorce	Description	Séquence
4294F	Modification ciblée 3'	TGCGAAAACCTGAACTTGTGC
4444R		CCTTAGGCGACTTTTGAACG
4294F	Modification ciblée 5'	TGCGAAAACCTGAACTTGTGC
4531F		TGTTGCTAGTGCTGGAGGTG
4859R		tagatcgaccggcatgcaagc
4860R		caaaatatagcgcgcaaactagg
4299R	eIF4E exon 2	CCTTAGCCCGGACACTAACA
4300F		CATGCACCTTGTTTGGTGAG
4598F	TALENs Fok1	AATCCGAGTTGAGGCACAAG
4598R		TTGCAGTTGGTGATGTGGTT
4404F	NptII court	AGACAATCGGCTGCTCTGAT
4404R		AGCCAACGCTATGTCCTGAT
4683F	NptII long	AAGCTTCAGCTTGCATGCCGGTCGATC
4736R		AAGCTTTCATACATGAGAATTAAGGG

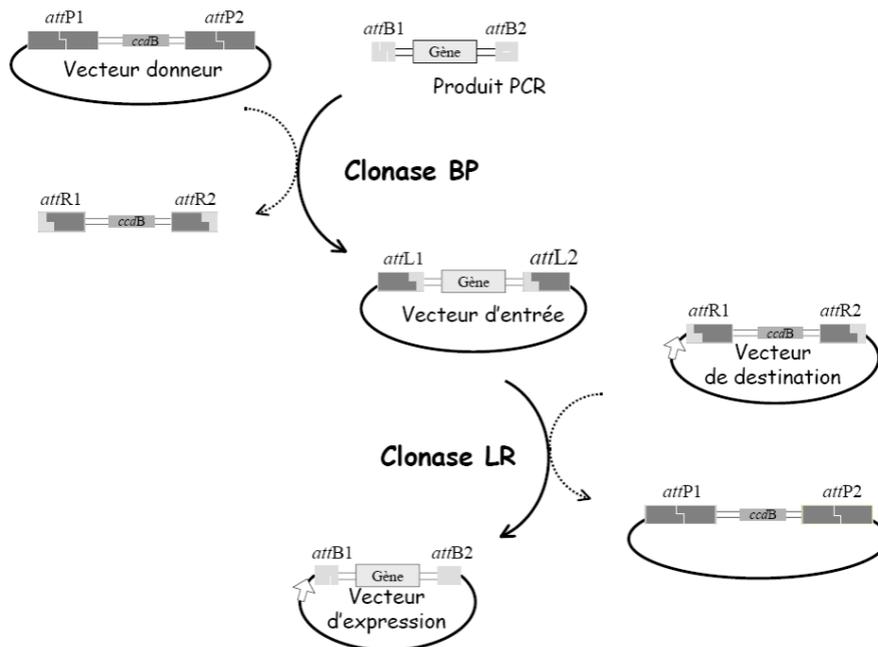


Figure 7. Principe du système de recombinaison Gateway.

Chaque réaction (BP et LR) consiste en une recombinaison entre les sites *attB* et *attP* ou *attL* et *attR*, permettant ainsi d'insérer le fragment voulu dans le vecteur plasmidique.

Les protoplastes ou feuilles broyées ont ensuite été resuspendus dans 600 μL de tampon de lyse (annexe XIII) et incubés à 65°C pendant 40 minutes. Un volume équivalent de chloroforme/alcool isoamylique (24 : 1) a été ajouté, et le mélange a été vortexé et centrifugé pendant 5 minutes à 10 000 rpm à 4°C. La phase supérieure a été transférée dans un nouveau tube et mélangée à 400 μL d'isopropanol froid par retournement. Chaque tube a été centrifugé 5 minutes à 10 000 rpm à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot a été lavé dans 400 μL d'éthanol à 70% froid puis séché 10 minutes à 65°C. L'ADN est finalement repris dans 100 μL de tampon TE.

4. Détection des modifications

Les plantules régénérantes et les protoplastes issus des transformations ont été analysés au niveau moléculaire par PCR avec des couples d'amorces permettant d'amplifier une partie du gène *NptII*, le gène de la nucléase FokI, la modification ciblée avec une amorce sens spécifique de la fin du gène *NptII* et une amorce antisens située en début d'intron juste après la zone d'homologie (tableau 2). Un dernier couple d'amorces a été utilisé pour amplifier la fin de l'intron eIF4E pour vérifier la qualité de l'extraction ADN. Les plantules intéressantes ont été envoyées à séquencer avec les amorces ayant servi à la détection par PCR.

C. Clonages moléculaires

Polymerase Chain Reaction

Pour tous les clonages réalisés, les inserts obtenus par amplification par PCR ont été réalisés à sur 50 à 100 ng d'ADN selon le programme suivant : dénaturation 5 min 95°C ; [45s 95°C, 45s à une température dépendante des oligos utilisés, 1 min d'élongation par kilobase d'ADN à amplifier à 72°C]x30 à 35 cycles ; 15min 72°C avec la GoTaqFlexi (Promega).

Réaction Gateway

Les réactions Gateway ont été réalisées avec la BP ou la LR clonase (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur (figure 10). Le mélange réactionnel contient 150 ng d'insert, 150 ng du plasmide de destination (réaction BP) ou du plasmide d'expression (réaction LR), 1 μL du mix contenant l'enzyme adaptée (BP ou LR clonase) dans un volume final de 10 μL de tampon TE (10 mM Tris pH 8, 1mM EDTA).

Mutagenèse dirigée

Les mutagenèses dirigées ont été réalisées avec le kit QuikChange Site Directed Mutagenesis XL (Agilent) selon les recommandations du fournisseur (figure 11).

Digestion enzymatique

Les digestions enzymatiques ont été réalisées à raison de 10 unités d'enzyme de restriction (New England Biolabs ou Promega) pour 1 μg d'ADN à digérer dans le tampon de digestion à une concentration finale de 1x, le tout dans un volume de 20 μL . Les déphosphorylations ont été réalisées dans un volume de 20 μL avec l'Antarctic Phosphatase (NEB) à raison de 5 unités d'enzyme pour 1 μg d'ADN, le tout dans le tampon de réaction 1x.

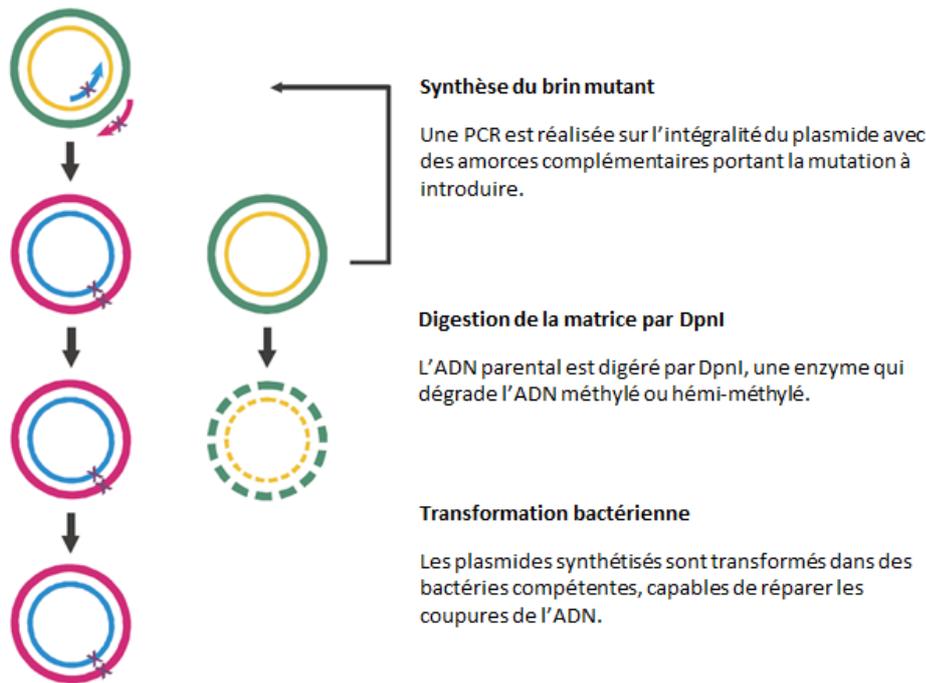


Figure 8. Principe de la mutagénèse dirigée.

Source: adapté de la notice du kit QuikChange Site Directed Mutagenesis XL (Agilent).

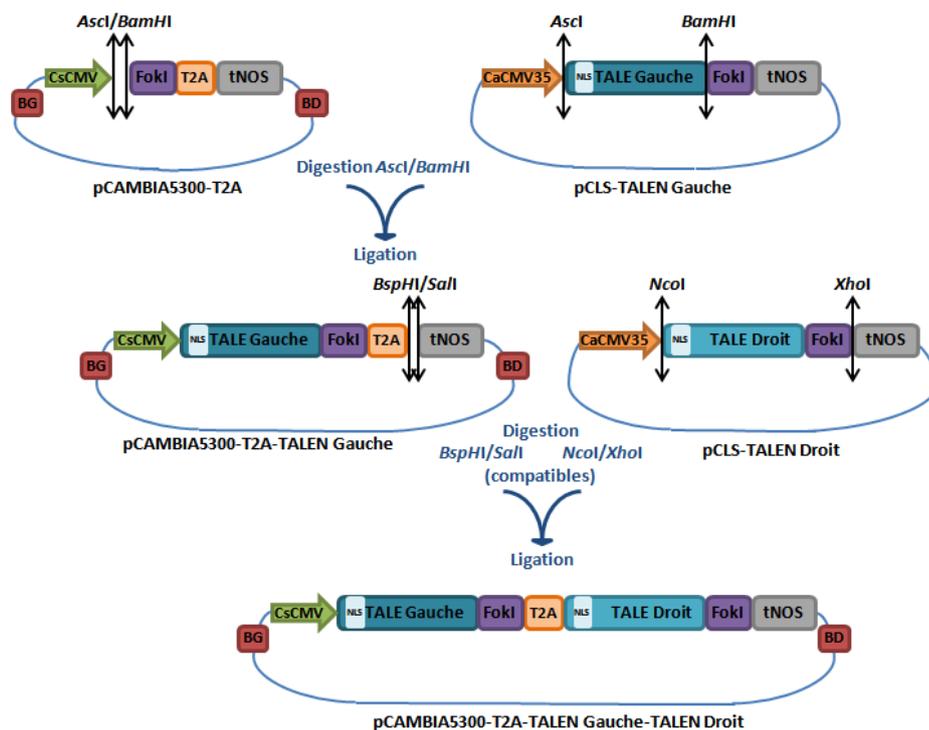


Figure 9. Construction des vecteurs binaires contenant chaque paire de TALEN®.

Les deux TALEN® sont séparés par un signal T2A et sont sous le contrôle du promoteur CsCMV (Cassava common mosaic virus), et du terminateur nopaline synthase (NOS). Le TALEN® gauche a été digéré par *Ascl/BamHI* et cloné dans le pCAMBIA5300 contenant le promoteur, la FokI et le terminateur NOS digéré *Ascl/BamHI*. Le TALEN® droit a lui été sorti *NcoI/XhoI* et cloné *BspHI/SalI* pour obtenir le plasmide binaire pCAMBIA T2A TALEN® couple contenant le couple de TALEN®, séparée par le signal T2A. BG: bordure gauche; BD bordure droite.

Ligation

Les ligations ont été réalisées dans un volume final de 20 µL avec un ratio vecteur plasmidique - insert de 1:3 et 5 unités de T4 DNA Ligase (NEB), dans le tampon de réaction adapté à une concentration 1x.

Transformation de bactéries compétentes

Pour chaque transformation, 0,5 µL de produit de ligation a été ajouté à 20 µL de bactéries. Ces bactéries ont été électroporées en subissant une impulsion de 370 kV à une capacité de 330 µF (Cell-Porator®, Sigma-Aldrich), puis mises en culture dans 900 µL de milieu SOC sous agitation 100 rpm à 37°C pendant 1h avant d'être étalées sur du milieu LB-agar-antibiotique et incubées à 37°C sur la nuit. Les bactéries transformées ont été mises en culture en milieu liquide pour extraire l'ADN plasmidique dans un volume de 6 mL de LB liquide pour les miniprep et de 400 mL de LB liquide pour les maxiprep, additionné de l'antibiotique adapté.

Extraction de l'ADN plasmidique

L'extraction d'ADN plasmidique pour les clonages a été réalisée à l'aide du kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) à partir de 4 mL de culture bactérienne. Pour l'extraction de grandes quantités d'ADN pour l'expression transitoire, le kit QIAprep Spin Maxiprep (Qiagen) a été utilisé à partir de 200 à 400 mL de culture bactérienne.

D. Réalisation des constructions TALEN®, CRISPR et matrice de remplacement

TALEN®

Chaque paire de TALEN® a été réunie dans un même vecteur binaire pCAMBIA T2A par clonage (figure 12) pour la transformation stable par *A. tumefaciens*. Dans un premier temps le TALEN® gauche a été sorti du pCLS par coupure avec les enzymes de restriction *Ascl/BamHI* et inséré dans le pCAMBIA T2A digéré par *Ascl/BamHI*. Puis dans un deuxième temps, le TALEN® droit a été sorti par coupure *NcoI/XhoI* et inséré dans le plasmide pCAMBIA T2A contenant le TALEN® gauche digéré par *BspHI/SalI* (compatibles) pour donner les pCAMBIA T2A TALEN® 222-224, pCAMBIA T2A TALEN® 226-228 et pCAMBIA T2A TALEN® 954-956.

CRISPR

Les trois premières constructions CRISPR ont été obtenues selon la méthode décrite par Fauser et al., 2014. Des amorces sens (F) et antisens (R) ont été synthétisés (Eurofins) correspondant à chaque protospacer avec des bouts cohésifs *BbsI* (tableau 3). 100 µmol des amorces 4655F/R, 4656F/R et 4657F/R dans 50 µL d'eau ont été dénaturés à 95°C à l'aide d'un thermocycleur pendant 5 minutes puis refroidis à température ambiante pendant 20 minutes. 3 µL de ces amorces ont été introduits dans le pEn-Chimera digéré par *BbsI* pour donner les pEntry-U6-CRISPR1, 2 et 3. Les trois CRISPR suivants ont été obtenus par synthèse par la société IDT du fragment de 500 paires de bases correspondant au protospacer et à l'ARN guide sous le contrôle du promoteur U3 ou U6 optimisé pour la tomate, encadrés par des sites attB1/2.

Chaque fragment a été inséré dans un pDONR/Zeo par réaction Gateway pour donner les pEntry-U3-CRISPR4 et 5 et le pEntry-U6-CRISPR6.

Pour réunir les CRISPR par paire, une PCR a été réalisée sur les CRISPR 1 et 2 avec les amorces 4800F/R contenant des sites *Sall* en bout flottant (tableau 3). La séquence ainsi amplifiée a ensuite été digérée par *Sall* et insérée dans le plasmide contenant le deuxième CRISPR digéré par *Sall* et déphosphorylé. Les couples CRISPR ainsi obtenus ont été séquencés.

Matrices de remplacement

Une nouvelle version de la matrice pour les TALEN[®] a été réalisée en encadrant la matrice originale par les sites de reconnaissance TALEN[®] site 1 pour favoriser la linéarisation de la matrice dans le but d'améliorer l'efficacité, appelée pUC57-TS1-Kana-Intron-eIF4E-TS1. Pour cela deux amorces correspondant à la fusion des séquences des deux sites de reconnaissance TALEN[®] sur le début de l'intron ont été synthétisées (Eurofins), avec des bouts cohésifs compatibles *PacI*. Les amorces 4664F/R (tableau 4) ont été hybridées par une dénaturation de 5 minutes à 95°C et refroidissement lent à température ambiante, puis phosphorylés par la Polynucléotide Kinase (NEB). Le fragment ainsi obtenu a été inséré dans le plasmide pUC57 contenant la matrice de remplacement ouvert par *PacI*. Pour l'insertion du site TALEN[®] en 3' de la séquence, une amorce sens couvrant le site de restriction *MfeI* et une amorce antisens suivie du site TALEN[®] et du site *AleI* en bout flottant (4748F/4749R, tableau 4) ont été utilisées. La PCR a été réalisée sur le pUC57 contenant la matrice pour obtenir un fragment de 371 pb, qui a été digéré par *MfeI/PmeI*. Ce fragment a été introduit aux mêmes sites dans le plasmide contenant la matrice préalablement digéré dans lequel le fragment correspondant a été éliminé par purification sur gel après digestion. La séquence de chaque insertion (site en 5' et site en 3') a été vérifiée par séquençage (Genoscreen).

Les nouvelles matrices de remplacement version CRISPR ont été réalisées par mutagenèse dirigée sur la matrice de base pUC57-Kana-Intron-eIF4E avec le kit QuikChange Site Directed Mutagenesis XL (Agilent) selon les indications du fournisseur pour reproduire les modifications *pot1* (tomate), *pep2* et *pep3* (piment) au niveau de l'exon 1. Les amorces utilisées sont listées dans le tableau 5.

III. RESULTATS

A. Mise au point des CRISPR pour la modification d'allèle

L'un des objectifs de ce stage était la mise au point de nouveaux outils : les CRISPR. La stratégie était en cours d'élaboration à mon arrivée, la conception des guides ARN et des matrices de remplacement était à mettre en œuvre et à finaliser. Le but a été de mettre en place différentes stratégies de clonage des guides ARN, pour aller vers l'obtention de données en expression transitoire pour vérifier le fonctionnement de ces outils sur leurs cibles et identifier la stratégie la plus intéressante.

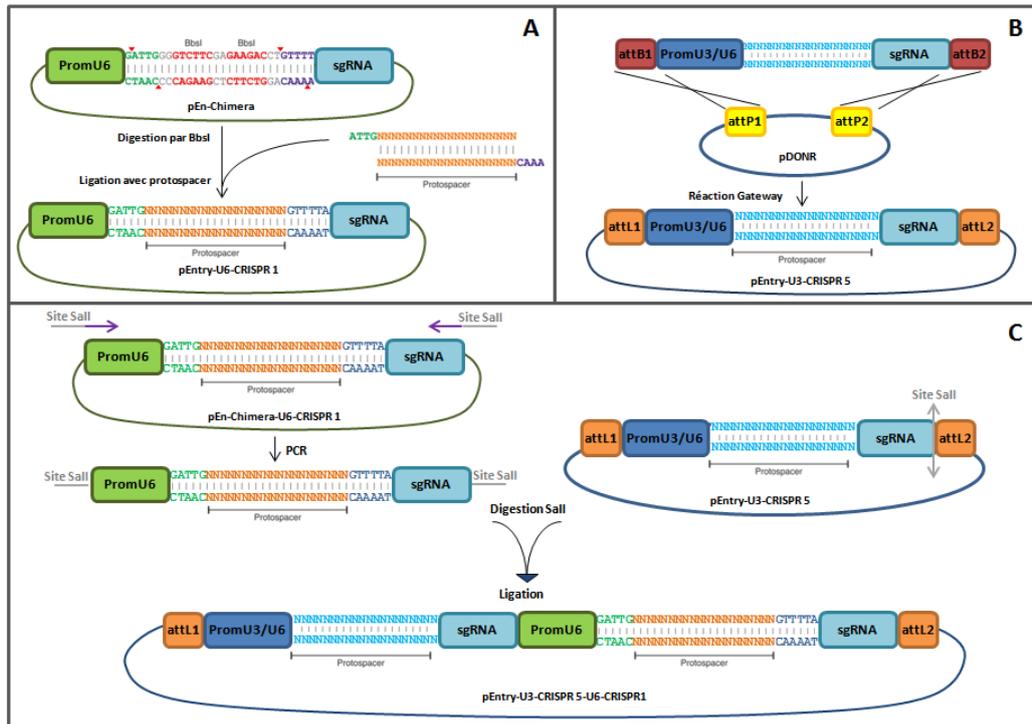


Figure 10. Mise au point des CRISPR ciblant l'exon 1.

A) La séquence de 20 paires de bases correspondant au protospacer encadrée par des boûts cohésifs BbsI a été insérée dans le plasmide pEn-Chimera digéré par BbsI pour donner le pEntry-U6-CRISPR 1. B) La séquence correspondant au promoteur U3 ou U6 suivi du protospacer et de l'ARN guide a été insérée dans le pDONR par réaction Gateway BP entre les sites attB1/2 de part et d'autre de la séquence synthétisée et les sites attP1/2 du plasmide receveur pour donner le pEntry-U3-CRISPR5. C) La séquence correspondant au promoteur U6, au protospacer et à l'ARN guide a été amplifiée par PCR avec des amorces spécifiques avec un site de restriction Sall à partir du pEntry-U6-CRISPR1. Les produits de PCR ont été digérés par Sall et ligués avec le plasmide pEntry-U3-CRISPR5 ouvert Sall pour obtenir le plasmide pEntry-U3-CRISPR5-U6-CRISPR1.

1. Mise au point des cibles CRISPR

- Définition des cibles

La première étape de ce travail a été la définition des cibles au niveau du gène *eIF4E*. Les cibles ont été déterminées au plus près des nucléotides ciblés pour les modifications souhaitées, selon les sites PAM présents sur la séquence *eIF4E* (figure 13). Les modifications à apporter sur l'exon 1 se situant dans deux régions séparées par une vingtaine de nucléotides, il a paru judicieux de mettre au point deux CRISPR ciblant chaque région. Un autre CRISPR a été mis au point ciblant l'exon 2, en amont des nucléotides à modifier (figure 13). Les trois plasmides correspondants à ces cibles ont été construits selon la stratégie décrite par Fauser et al., 2014 (figure 14, A) et la séquence du guide ARN a été validée par séquençage.

- Stratégie double ARN guide

Suite aux conseils d'un des partenaires de GENIUS (F. Nogué, INRA Versailles) disposant déjà d'expérience sur les CRISPR, il a semblé plus judicieux de mettre en place une stratégie visant à faciliter la mise en évidence de coupures. Des paires de guides ARN ont été définies afin de favoriser les coupures et de réaliser des délétions de 150 pb, plus faciles à mettre en évidence que des insertions ou délétions de quelques nucléotides. Pour cela, trois nouveaux CRISPR ont été définis ciblant le début de l'intron (CRISPR5, pour fonctionner avec les CRISPR1 et 2), la fin de l'intron (CRISPR6, pour fonctionner avec les CRISPR sur l'exon 2) et enfin un deuxième CRISPR ciblant l'exon 2 (CRISPR4), plus proche du site à modifier (figure 14, B). Le regroupement des CRISPR en paires implique que chaque CRISPR soit si possible sous le contrôle d'un promoteur différent (U3 et U6). Ainsi, les CRISPR 1 et 2 étant sous le contrôle du promoteur U6, le CRISPR5 a été placé sous le contrôle du promoteur U3. Le design des différents CRISPR utilisés dans cette étude a été validé en tenant compte des résultats donnés par différents logiciels récemment mis à disposition sur le web (Boutros lab, 2015; Zhang Lab, 2015; TEFOR Infrastructure, 2015).

2. Mise au point de la matrice de remplacement pour les CRISPR

La matrice de remplacement disponible n'était pas adaptée pour les CRISPR, car les sites de reconnaissance CRISPR y étaient présents et rendaient donc cette matrice inutilisable car elle aurait été elle-même la cible de coupures. De plus, nous souhaitions réaliser d'autres matrices de remplacement correspondant aux modifications *pep2*, *pep3* et *pot1*, correspondant à différentes versions de *eIF4E* modifié et basées sur des études en amont d'allèles de résistance piment.

- Modification des sites de reconnaissance des CRISPR

Les nouvelles matrices ont été réalisées par mutagenèse dirigée à partir de la première matrice *pep1*. Une première modification a tout d'abord été réalisée, consistant en l'élimination du site PAM du début de l'intron pour empêcher le CRISPR5 de reconnaître et couper la matrice de remplacement (figure 15). A partir de cette nouvelle matrice de remplacement, qui correspond à la version CRISPR de la matrice *pep1*, plusieurs mutagenèses dirigées ont été réalisées pour modifier les sites de reconnaissance des CRISPR 1 et 2 au niveau de l'exon 1 en mettant à profit la dégénérescence du code génétique.

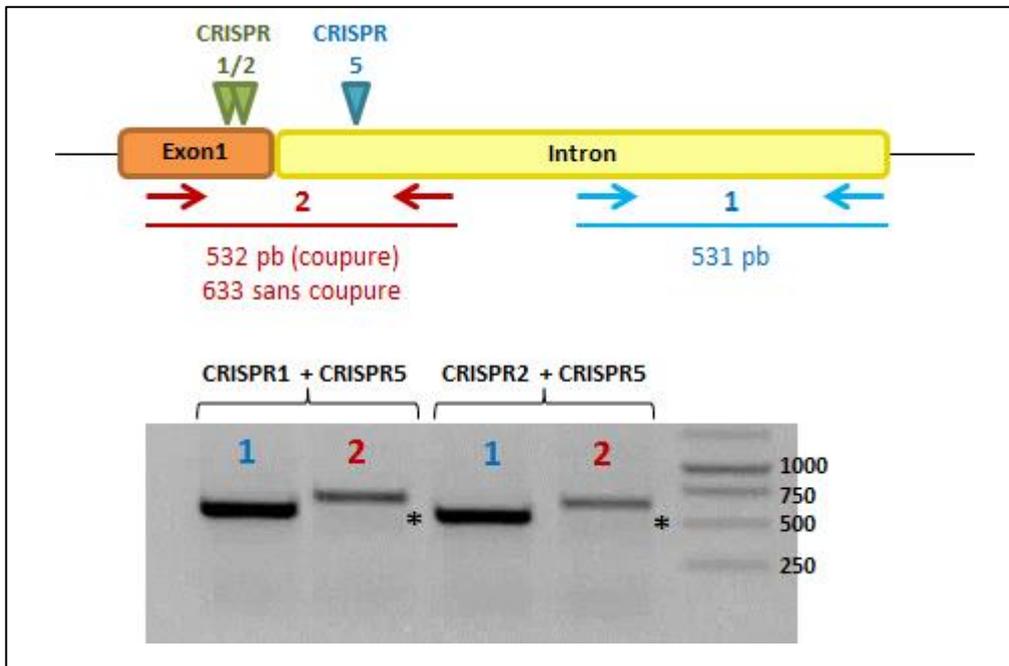


Figure 11. Détection des coupures par les CRISPR en expression transitoire par PCR.

Les sites de coupure des CRISPR 1 et 2 sont représentés par des triangles verts; celui du CRISPR 5 par un triangle bleu. La PCR avec le couple d'amorces 1 (bleue) a permis de vérifier la qualité de l'ADN pour la PCR. La PCR avec le couple d'amorces 2 (rouge) devrait permettre d'amplifier une bande de 633pb si l'ADN n'a pas été coupé, et 532pb si la coupure par les CRISPR a eu lieu. Une bande de faible intensité est visible à la taille attendue (*).

- Réalisation des versions basées sur les allèles piment

En parallèle de la modification des sites de reconnaissance des CRISPR, les modifications *pep2*, *pep3* et *pot1* (figure 15) ont été obtenues par mutagenèse dirigée. Dans les trois matrices réalisées ainsi, je me suis concentrée sur les modifications au niveau de l'exon 1. Les matrices *pep1*, *pep2* et *pot1* ont ainsi été obtenues, et il reste à réaliser une mutagenèse pour obtenir la matrice *pep3* qui comportait des mutations indésirables dans sa séquence.

3. Expression transitoire des CRISPR en protoplaste

- Electroporation de protoplastes avec les trois premiers CRISPR obtenus

Une première expérience d'expression transitoire des CRISPR a été réalisée avec les trois premiers CRISPR (exons 1 et 2), en électroporant les protoplastes avec chaque CRISPR ciblant l'exon 1 associé au CRISPR ciblant l'exon 2, ainsi que la Cas9. La délétion recherchée n'a cependant pas pu être mise en évidence par PCR. Il est possible que la transformation de protoplastes avec les trois constructions à la fois n'ait pas été assez efficace pour obtenir la double coupure. Cependant, la taille de l'intron (1669 pb) et donc de la délétion peut être difficile à obtenir et nous ne pouvons pas conclure à ce stade sur l'efficacité des CRISPR.

- Electroporation de protoplastes avec les nouveaux CRISPR

L'expérience suivante a donc consisté à électroporer les protoplastes avec les CRISPR1 ou 2 ciblant l'exon 1 et le CRISPR 5 ciblant le début pour l'intron, pour réaliser une coupure plus petite de 127 pb ou 148 pb. Cependant, l'électroporation avec les CRISPR sur des plasmides séparés n'a pas permis de mettre en évidence la coupure attendue.

Des électroporations ont également été réalisées avec les couples CRISPR (CRISPR 1-5 et CRISPR 2-5 uniquement, les CRISPR ciblant l'exon 2 n'ont pas été testés) avec la matrice de remplacement *pep1*, *pep2* et *pot1* version CRISPR, pour mettre en évidence au moins la coupure et au mieux le remplacement d'allèle. La PCR réalisée avec des amorces de part et d'autre de la délétion recherchée a amplifié préférentiellement l'ADN génomique d'origine, et le produit d'amplification correspondant à la délétion est très peu visible (figure 16). Pour mettre en évidence la présence de la coupure, l'ADN extrait des protoplastes a été digéré avant la PCR par une enzyme de restriction présente dans la séquence d'ADN délétée par coupure par les CRISPR, mais les résultats n'ont pas été concluants (pas d'amplification). Aucun événement de remplacement n'a pu être détecté dans cette expérience. Il est possible que le temps d'incubation des protoplastes après électroporation ait été trop court pour que la modification ait lieu (3 jours), ou que l'efficacité de transformation avec les trois plasmides à la fois soit trop faible pour déclencher cet événement. De nouveaux essais sont actuellement en cours au laboratoire afin d'optimiser différents facteurs qui devraient permettre d'obtenir des résultats plus concluants.

4. Transformation stable par biolistique avec les CRISPR

Bien que les résultats obtenus par transformation transitoire en protoplaste ne permettent pas de conclure sur l'efficacité de coupure des CRISPR, une expérience de biolistique a été mise en place.

Tableau 3. Organisation de la transformation par biolistique avec les CRISPR.

Puissance de tir	Nb de tirs par boîte	Témoin	CRISPR 2 + CRISPR 5 Cas9 (plasmides)	
			pep2 (plasmide)	pep1 (plasmide)
900 PSI	1 tir	2 boîtes sans tir	75	73
	2 tirs		79	84
	2 tirs		70	73
1100 PSI	1 tir		82	68
	2 tirs		71	74
Total explants			377	372

Tableau 4. Organisation de la transformation par biolistique avec les TALEN®.

	Tirs par boîte	Jour de transfert sur milieu sélectif	Témoin sans tir -	TALEN site 1 v1 pCLS23222 + pCLS23224		TALEN site 1 v2 pCLS23226 + pCLS23228		
				Plasmide pBGWDO Kana Intron	pBGWDO linéarisé	Plasmide pBGWDO Kana Intron	pBGWDO linéarisé	
1100 PSI	1	J1	6 boîtes sans tir	66	60	61	80	
	1	J2		80	86	88	53	
	1	J3		49	87	54	57	
	2	J1		69	104	70	101	
	2	J2		51	92	70	41	
900 PSI	1	J1		76	93	62	82	
	2	J2	75	69	48	89		
Nombre d'explants générés				466	591	453	503	2013

Pour chaque combinaison, le nombre d'explants obtenus pour les différents paramètres est indiqué. Les tirs ont été réalisés à des puissances de 1100 et 900 PSI, et chaque boîte contenant les feuilles ayant permis l'obtention des explants a été bombardée 1 ou 2 fois. Le jour de transfert sur le milieu de régénération sélectif est aussi indiqué (J1 – transfert 24h après le découpage des explants, jour 2 48h après et jour 3 72h après).

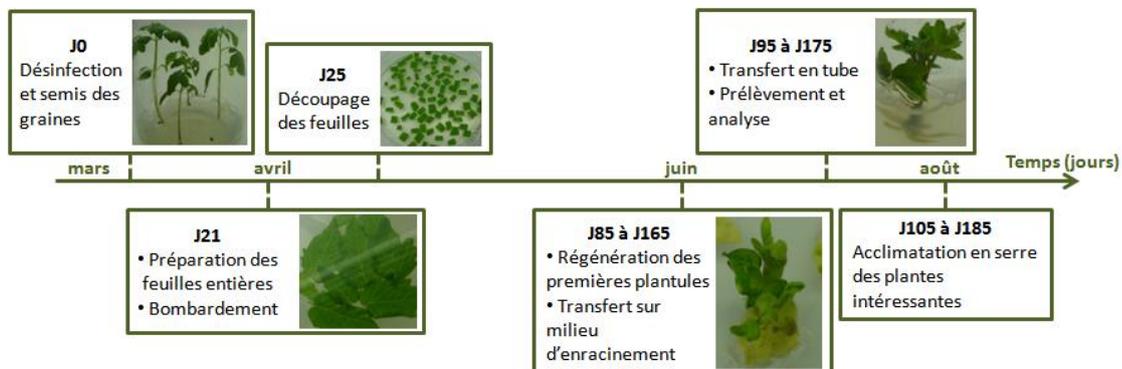


Figure 12. Récapitulatif des étapes clés de la première expérience de transformation par biolistique.

Les différentes matrices version CRISPR disponibles *pep1* et *pep2* ainsi que les CRISPR2 et CRISPR5 (tableau 6) ont été utilisés dans le but d'obtenir la preuve de coupure par les CRISPR en transformation stable, et si possible d'obtenir des plantes modifiées avec la matrice de remplacement. Les premières plantules n'ont pas encore régénéré mais les premiers résultats devraient être obtenus dans les semaines à venir.

B. Mise en œuvre des TALEN® chez la tomate

Un des objectifs de ce stage était aussi de mettre en œuvre les TALEN® pour faire la preuve de leur efficacité chez la tomate. Les plasmides contenant les TALEN® construits par Collectis étaient déjà disponibles à mon arrivée, de même que la matrice de remplacement pour faire de la modification d'allèle. De plus, la preuve de la coupure par les TALEN® avait déjà été obtenue en transformation transitoire en protoplaste. L'étape suivante a donc été de réaliser de la transformation stable avec les TALEN®. Une première expérience de biolistique avait déjà été réalisée au laboratoire, mais tous les paramètres permettant une éventuelle optimisation n'avaient pas été testés. Le but de cette expérience était donc de contribuer à la mise au point de la transformation de la tomate par biolistique, tout en cherchant à apporter des preuves de coupure et de modification au niveau du site cible des TALEN®.

1. Transformation stable par biolistique

La première expérience de biolistique avait déjà été réalisée au laboratoire à partir de différents types d'explants: feuilles et cotylédons entiers ou coupés. Cette expérience avait permis de déterminer que le bombardement de feuilles entières donnait les meilleurs résultats. L'optimisation de la transformation par biolistique chez la tomate a donc été approfondie lors de ce stage en travaillant sur des feuilles entières et en faisant varier 4 paramètres : la date de repiquage sur milieu sélectif, le nombre de tirs réalisés par boîte d'explants, la puissance de tir et la forme de l'ADN bombardé (plasmide ou linéaire).

Dans une première expérience, les deux couples de TALEN® ciblant l'exon 1 en association avec la matrice de remplacement sous forme plasmidique ou linéarisée par *Pacl/PmeI* ont été introduits par biolistique dans des cellules de feuilles de tomate (tableau 7). Au total, 385 feuilles ont été ainsi été bombardées, qui ont ensuite été découpées pour générer 2013 explants (tableau 7). Les premières plantules ont commencé à apparaître 60 jours post-bombardement (figure 17) et les plantules régénérantes ont été systématiquement analysées au niveau moléculaire. Des témoins WVA106 non bombardés ont aussi été réalisés pour vérifier que le milieu de régénération sans agent de sélection permette bien la régénération de plantules, et au contraire que le milieu de régénération sélectif ne permette pas la régénération de plantules non transformées.

Comparaison des efficacités de transformations pour les différents paramètres

Sur les 2013 explants bombardés, 223 ont donné naissance à au moins une plantule. Chaque plantule a été analysée au niveau moléculaire pour vérifier la présence de la FokI et d'une partie du gène *NptII* conférant la résistance à la kanamycine.

Tableau 5. Influence de la forme de la matrice sur l'efficacité de transformation.

Matrice	Total explants	Explants <i>NptII</i>	%Transfo
Plasmide	897	22	2,39
Linéaire	1032	62	5,67

$X^2=13,38$ (>3,84) effet significatif.

Tableau 6. Influence du nombre de tirs sur l'efficacité de transformation.

Tirs/boîte d'explants	Total explants	Explants <i>NptII</i>	%Transfo
1	799	30	3,62
2	879	43	4,66

$X^2=1,19$ (<3,84) effet non significatif.

Tableau 7. Influence de la puissance de tir sur l'efficacité de transformation.

Puissance	Total explants	Explants <i>NptII</i>	%Transfo
900	581	13	2,19
1100	447	23	4,89

$X^2=5,87$ (>3,84) effet significatif.

Tableau 8. Influence de la date de transfert sur milieu sélectif sur l'efficacité de transformation.

Date	Total Explants	Explants <i>NptII</i>	%Transfo
J1	1064	36	3.38
J2	614	37	6.03
J3	335	11	3.28

$X^2 = 3,45$ (<5,99) effet non significatif.

A partir de ces données, l'efficacité de transformation a été définie comme le nombre d'explants ayant donné naissance à au moins une plantule transformée avec la matrice portant le gène *NptII*, rapporté au nombre total d'explants bombardés. L'efficacité de transformation pour l'expérience, tous paramètres confondus, est de 4,2%. Etant donné les contraintes matérielles, le nombre de répétitions n'a pas été le même pour chaque paramètre, aussi les tests de significativité n'ont pas toujours été réalisés sur les effectifs complets. Un test de Chi2 à un seuil de 5% a été réalisé pour chaque paramètre pour identifier ceux ayant un effet significatif sur l'efficacité de transformation.

- Linéarisation de la matrice porteuse du gène de résistance *NptII*

Les efficacités de transformation ont été déterminées sur les effectifs complets pour les essais réalisés avec la matrice sous forme plasmidique ou linéaire. L'efficacité de transformation obtenue avec la matrice sous forme linéaire est de 5,7%, significativement différente de 2,4% si la matrice est sous forme plasmidique (tableau 8).

- Nombre de tirs réalisés par boîte d'explants

Les efficacités de transformation obtenues avec 1 ou 2 tirs ont été déterminées à partir des données obtenues pour les explants bombardés à 900 et 1100 PSI transférés sur milieu sélectif en J1 et J2. Le test du Chi2 n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative au seuil de 5% entre les efficacités de transformation à 1 ou 2 tirs, qui sont de 3,62% et 4,66% respectivement (tableau 9).

- Puissance de tir

Pour déterminer si la puissance de tir a un impact sur l'efficacité de transformation, seules les données obtenues pour les explants transférés en jour 1, ont été exploitées puisque les tirs à 900 PSI ont tous été transférés le premier jour. Les données obtenues pour le nombre de tirs (1 et 2) ont été rassemblées pour ne prendre en compte que la puissance de tir dans le test Chi2 (tableau 10). L'efficacité de transformation est significativement plus importante quand les tirs sont réalisés à une puissance de 1100PSI avec 4,89%, comparé à 2,19% à 900PSI.

- Date de transfert sur milieu sélectif

Les efficacités de transformation obtenues à J1, J2 et J3 ont été déterminées à partir des données obtenues pour les explants bombardés à 1100PSI, ayant subi 1 ou 2 tirs. En effet tous les explants bombardés à 900PSI ont été transférés sur milieu sélectif en J1 et leur prise en compte risquerait de fausser le test de Chi2. Les efficacités de transformations obtenues ne sont pas significativement différentes, avec 4,89% en J1, 6,03% en J2 et 3,28% en J3 (tableau 11). La plus faible efficacité obtenue en J3 est probablement due à des effectifs plus faibles.

Les paramètres influençant le plus l'efficacité semblent donc être la forme de la matrice qui apporte le gène de résistance ainsi que la puissance de tir, avec une efficacité maximale pour une matrice linéaire et une puissance de 1100PSI. Le nombre de tirs ainsi que le jour de transfert des explants sur milieu sélectif ne semblent pas clairement avoir d'impact.

Tableau 9. Plantules transformées par *NptII* ayant pris racine sur milieu sélectif de racinement.

Essai	Plantules analysées	Plantules <i>Npt II</i>	Plantules Racinées	%Racinement
1	30	14	13	92,9
2	53	23	17	73,9
3	8	3	1	33,3
4	38	20	14	70,0

Tableau 10. Plantules négatives en PCR *NptII* ayant pris racine sur milieu sélectif de racinement.

Essai	Plantules analysées	Echappées racinées	%Echappées
1	30	1	3,33
2	53	8	15,09
3	8	2	25,00
4	38	5	13,16

Tableau 11. Plantules transformées par *NptII* ayant aussi intégré la FokI.

Essai	Plantules <i>Npt II</i>	Plantules FokI	% <i>Npt II</i> /FokI
1	14	2	14,29
2	17	6	35,29
3	1	0	0,00
4	14	1	7,14

Il est possible qu'une matrice sous forme linéaire s'insère plus facilement car elle est reconnue par la machinerie de réparation de l'ADN qui cherche à la réintégrer dans le génome. Pour ce qui est de la puissance, 900PSI n'est peut-être pas suffisant pour que les billes d'or sur lesquelles est fixé l'ADN pénètrent dans les cellules.

Analyse moléculaire des plantules ayant intégré la matrice

- **Intérêt de la PCR sur *NptII* pour détecter les plantules transformées**

Toutes les plantules chez lesquelles une partie du gène *NptII* a été détectée par PCR n'ont pas donné de racines sur milieu de racinement (tableau 12). Cependant, si l'on exclut l'essai 3 pour lequel les effectifs sont très peu nombreux, les efficacités de régénération des plantules *NptII* (transformées par la matrice) sont supérieures à 70%. Il est possible que les plantules chez lesquelles une partie de *NptII* a été détectée, mais qui n'ont pas réussi à régénérer sur milieu d'enracinement correspondent à des versions tronquées remaniées du gène *NptII* lors de l'insertion dans le génome, qui ne serait alors plus fonctionnel. La détection d'une partie de *NptII* par PCR chez une plantule semble donc bien correspondre à un événement de transformation.

- **La sélection par la kanamycine n'est pas totalement efficace**

Malgré la présence de l'agent sélectif dans le milieu de régénération, 7% des explants bombardés ont donné naissance à des plantules ne possédant pas le gène *NptII* inséré dans leur génome, ayant donc échappé à la sélection. Ce pourcentage d'échappées est indépendant des paramètres utilisés pour le bombardement. De plus, 3 à 25% de ces échappées donnent des racines sur milieu de racinement (tableau 13). La concentration en kanamycine des milieux de régénération et de racinement n'est peut être pas suffisamment élevée pour empêcher la régénération d'explants non transformés. Cependant, aucun des témoins sensibles (WV106 non bombardé) cultivé sur milieu de régénération sélectif n'a régénéré, ce qui semble indiquer que la concentration en kanamycine est suffisante. Les plantules échappées ont pu profiter de la proximité d'autres cellules transformées et résistantes à la kanamycine. Cependant, la plupart proviennent d'explants n'ayant donné aucune autre plantule résistante. Il semble peu concevable de remettre en cause la PCR *NptII* car un contrôle de qualité de l'ADN avait été effectué (avec des amorces situées sur l'ADN génomique). Ce type de résultats n'est pas observé sur milieu sélectif kanamycine lors de transformations via *A. tumefaciens*, et semble donc propre à la technique de biolistique. Il est possible que les quantités d'ADN envoyées sur les billes persistent un certain temps dans les cellules végétales sans s'intégrer, et permettent ainsi à certaines plantules de se développer sur milieu sélectif.

- **Efficacité de transformation avec plusieurs constructions**

Les explants ayant été bombardés avec la matrice de remplacement mais aussi avec les deux plasmides contenant les TALEN® droit et gauche, la présence de la FokI a aussi été recherchée au niveau moléculaire. Le pourcentage de plantules ayant intégré la matrice avec le gène *NptII* et au moins un TALEN® avec la FokI est variable selon les essais, entre 7 et 35%, les effectifs pour l'essai 3 étant trop faibles être représentatifs (tableau 14).

Tableau 12. Récapitulatif des paramètres de biolistique pour les 5 plantules modifiées.

Plantule	Couple TALEN	Forme matrice	Nombre Tirs	Puissance	Date de transfert
126	222-224	Plasmide	2	1100	J2
202b	222-224	Linéaire	2	900	J1
222	222-224	Linéaire	2	1100	J1
146	222-224	Plasmide	1	1100	J2
266	222-224	Linéaire	1	1100	J2

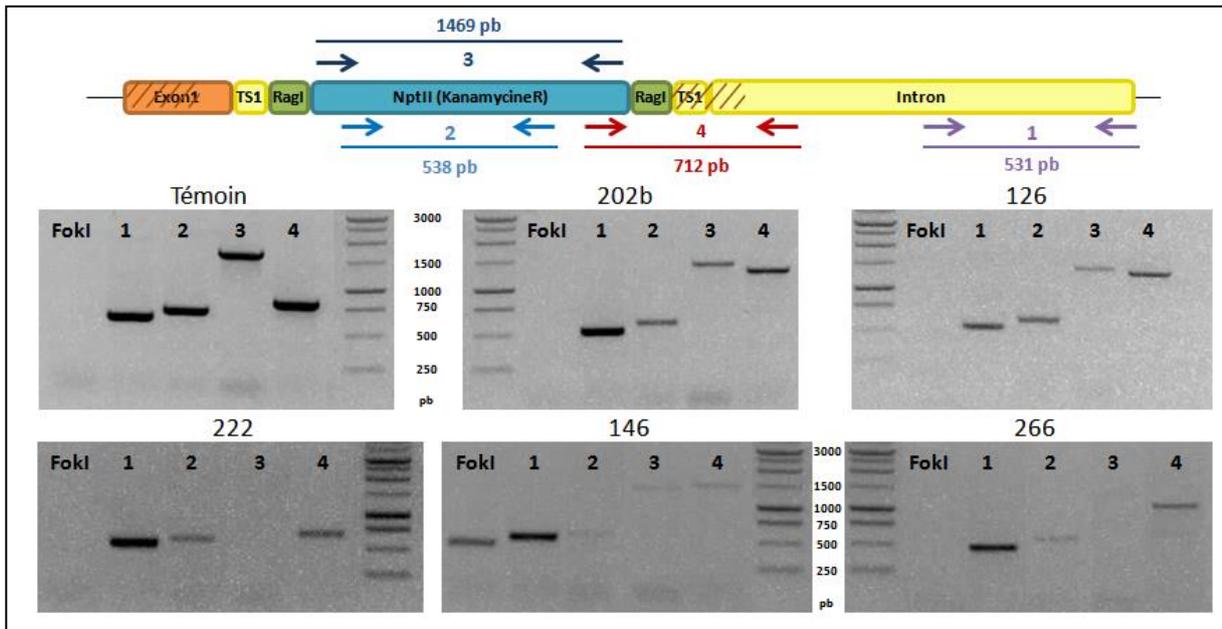


Figure 13. Profil PCR des cinq plantules modifiées obtenues.

Chaque plantule régénérante a été analysée par PCR avec les couples d'amorces amplifiant la FokI (non représentée), la fin de l'intron *eIF4E* pour vérifier la qualité de l'ADN (1), le milieu du gène *NptII* (2), le gène *NptII* entier (3) et enfin la modification ciblée (4). Les plantules 126 et 146 sont issues d'explants bombardés avec la matrice sous forme plasmidique et les plantules 202b, 222 et 266 d'explants bombardés avec la matrice linéarisée.

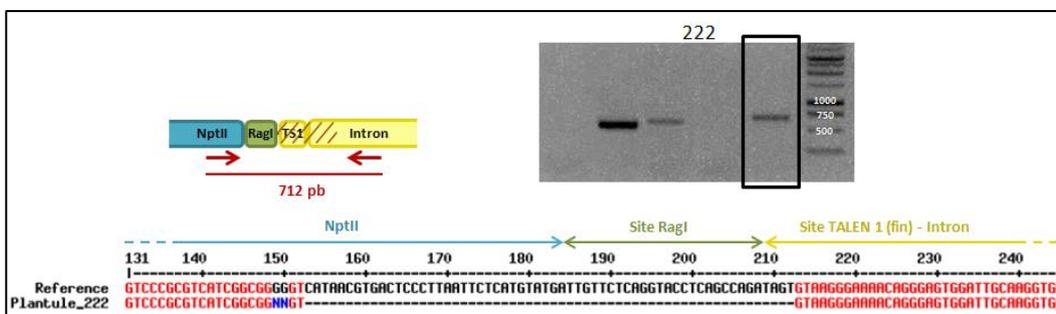


Figure 14. Séquencage de la plantule 222.

Haut: la PCR sur l'ADN extrait de la plantule 222 a amplifié une bande de ~600pb au lieu des 712 pb attendus pour une modification parfaite. Bas: le séquençage du produit de PCR a permis de mettre en évidence une délétion de 62pb au niveau de la fin du gène *NptII* et du site *RagI*.

La chance de transformer un explant avec trois constructions à la fois est donc beaucoup plus faible que celle calculée uniquement à partir du gène ayant servi à la sélection. Cependant, l'ADN correspondant aux trois constructions est fixé sur des billes qui servent ensuite à bombarder les feuilles. Une cellule transformée par la matrice de remplacement a donc de grandes chances d'avoir aussi reçu les autres plasmides portés par la bille, même s'ils ne s'intègrent pas au génome faute de pression sélective. De plus dans le cas des TALEN®, l'insertion stable dans le génome n'est pas nécessairement recherchée, mais plutôt une expression transitoire aux premières phases de la transformation.

2. Recherche de la modification ciblée de *eIF4E*

Chaque plantule transférée sur milieu d'enracinement a été analysée avec des amorces permettant d'amplifier les frontières 5' et 3' de l'insertion ciblée de la matrice, les couples d'amorces ayant été testés sur des plantes témoins transformées avec la matrice contenant la séquence complète du gène *eIF4E* modifié.

- Identification de plantes modifiées imparfaitement

Sur les 315 plantules analysées, une amplification par PCR a été mise en évidence pour le côté 3' de la modification pour cinq plantules. Toutes sont issues d'essais réalisés avec le couple de TALEN® 222-224 sous forme plasmidique et linéarisée, avec différents paramètres de biolistique (tableau 15). Une étude plus approfondie par PCR n'a pas permis d'obtenir la taille attendue pour une modification ciblée parfaite puisque la bande attendue a une taille de 712 pb, et que les bandes observées sont plus proches de 1500 pb à l'exception de la plantule 222, pour laquelle la taille de la bande est plus proche de 600 pb (figure 18). Les produits de PCR ont été séquencés avec les amorces ayant servi à la détection pour obtenir plus d'informations sur l'évènement d'insertion de la matrice.

Le séquençage du produit de PCR réalisée sur la plantule 222 a permis de mettre en évidence une délétion de 63 pb au niveau de la fin du gène *NptII* et du site *RagI* (figure 19), qui pourrait expliquer ses difficultés à prendre racine sur milieu sélectif. Le séquençage des produits de PCR des quatre autres plantules n'a pas permis de mettre en évidence la cause de la taille supérieure à celle attendue par PCR (~1500 pb au lieu de 712 pb), mais une digestion de la PCR par *MfeI* a montré la présence d'une duplication (figure 20). Cette duplication semble correspondre à la région d'homologie et indiquerait une insertion de la matrice au niveau de la coupure, sans qu'il y ait eu de réparation parfaite par recombinaison homologue. Des modifications similaires ont été constatées pour 4 plantules, quelle que soit la forme sous laquelle la matrice a été délivrée (linéaire ou plasmidique). Cela semble éliminer l'hypothèse d'une insertion du plasmide au-delà du fragment de *eIF4E* pour la taille supérieure à celle attendue pour l'insertion simple de la matrice. Il serait intéressant de le vérifier en utilisant des amorces sur le plasmide en amont.

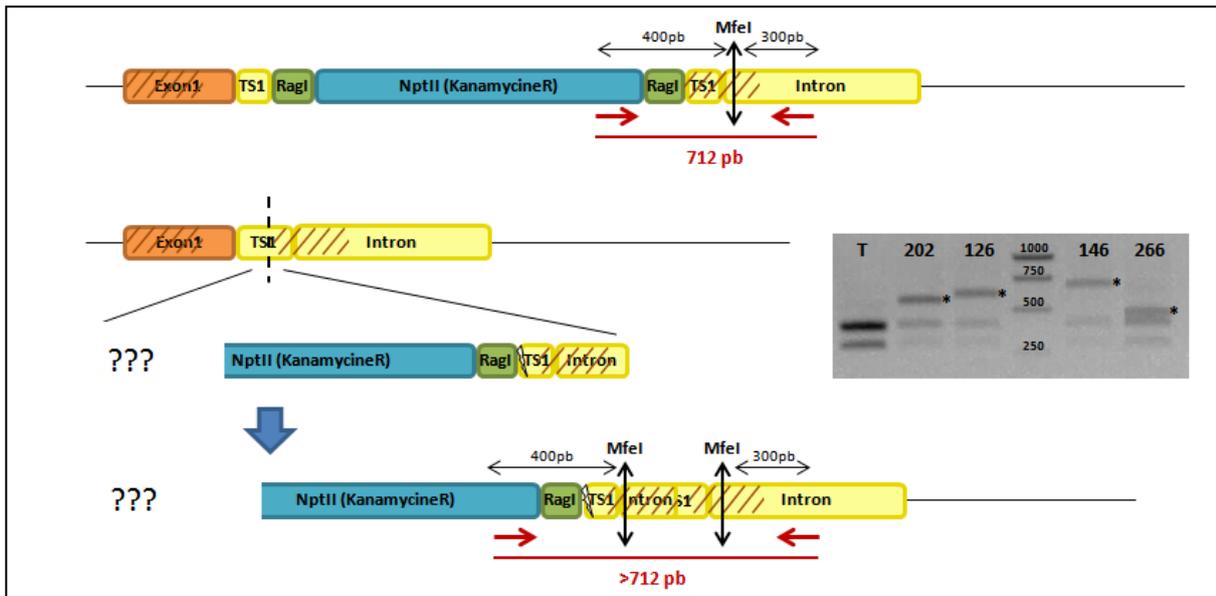


Figure 15. Représentation de l'évènement d'insertion de la matrice au niveau de *eIF4E*.

En haut, gène *eIF4E* modifié parfaitement par recombinaison homologue. En bas, insertion de la matrice de remplacement au niveau de la coupure double brin sur *eIF4E*. Le gel sur la droite montre les profils de digestion par *MfeI* obtenus sur les 4 plantules et la plante témoin (T) qui a été transformée avec la matrice de remplacement version longue. Pour ces 4 plantules, les bandes de 400 et 300pb attendues sont bien présentes, ainsi qu'une bande supplémentaire (*) de taille variable qui correspondrait à la taille du fragment dupliqué. Aucune information n'a pu être obtenue sur la séquence en 5' de l'insertion.

- Pas d'informations sur la modification en 5'

Plusieurs couples d'amorces ont été testés pour mettre en évidence la frontière de la modification en 5', mais aucun n'a permis d'obtenir d'amplification, même avec des paramètres de PCR différents comme un temps d'élongation plus long ou plus de cycles, alors même qu'ils fonctionnaient sur l'ADN issu des plantes témoins.

- Absence de la FokI

Parmi les cinq plantules modifiées imparfaitement, la FokI n'a été détectée que chez la 146 (figure 18). Cependant, pour que la matrice s'insère au niveau du site cible sur *eIF4E*, il a dû y avoir coupure par les TALEN®. Cela semble indiquer que la coupure par les TALEN® se fait pendant la phase d'expression transitoire avant la mise en place de la sélection, puisqu'aucun TALEN® n'a été intégré au génome et que la coupure a tout de même eu lieu.

IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les objectifs de ce stage étaient de mettre en œuvre les deux outils de ciblage génique TALEN® et CRISPR/Cas9 chez la tomate en ciblant des régions du gène *eIF4E* potentiellement impliquées dans l'interaction plante-potyvirus. En raison de l'apparition récente de l'outil CRISPR/Cas9, les travaux concernant les deux outils n'étaient pas au même niveau d'avancement. Il a donc été question de concevoir et réaliser les constructions pour les CRISPR, et de mettre en œuvre les TALEN® dans le cadre d'expériences de transformation stable chez la tomate.

TALEN®

Les expérimentations mises en œuvre avec les TALEN® visaient à optimiser la technique de transformation par biolistique, ainsi qu'à réaliser les premiers essais en apportant une matrice de remplacement dans le but d'obtenir des plantes modifiées au niveau d'une région du gène *eIF4E*.

L'efficacité de transformation globale de 4,2% obtenue pour biolistique semble comparable à ce qui a été obtenu chez d'autres espèces (Frame et al., 2000; Tassy et al., 2014), et est plus faible que l'efficacité obtenue par transformation via *A. tumefaciens* (Sharma et al., 2009). Deux paramètres clés ont été identifiés comme influençant significativement l'efficacité de transformation: l'utilisation d'ADN linéarisé et l'augmentation de la puissance de tir à 1100PSI. Ces résultats sont en accord avec des données publiées chez le blé, qui avaient mis en évidence la meilleure efficacité de transformation avec de l'ADN linéarisé (Tassy et al., 2014). La biolistique est une technique beaucoup plus rapide à mettre en œuvre que la transformation par *A. tumefaciens* car elle ne nécessite pas de clonages préalables dans des vecteurs binaires, ce qui en fait une technique intéressante pour le ciblage génique.

Un nombre assez important de plantules non transformées apparaissent sur milieu sélectif de régénération. Cependant, la sélection reste efficace au stade enracinement puisque peu de ces échappées prennent racine.

Tableau 13. Organisation de la biolistique avec les TALEN® linéarisés.

	Nb de tirs par boîte	Témoin sans tir	EIF4E TALEN S1.1+S2 954-956+222-224		EIF4E TALEN S1.2+S2 954-956+226-228	
			Tout linéaire	TALEN Plasmide Matrice linéaire	Tout linéaire	
		-				
1100 PSI	1 tir	2 boîtes	80	95	88	
	2 tirs		122	161	165	
	2 tirs					
900 PSI	1 tir		72	68	92	
	2 tirs		76	94	93	
Total Explants				350	418	438

Il pourrait être intéressant de tester des concentrations en kanamycine plus élevées dans le milieu de régénération pour voir s'il serait possible de limiter la quantité de plantules à manipuler jusqu'au stade enracinement. De plus, plutôt que d'analyser systématiquement toutes les plantules qui régénèrent depuis les explants, nous savons maintenant qu'il suffit de n'analyser que celles qui prennent racine.

Des expériences d'expression transitoire en protoplastes réalisées au laboratoire avant mon arrivée avaient déjà permis de montrer que les paires de TALEN[®] étaient fonctionnelles. Par biolistique, nous avons montré qu'il est possible de réaliser une coupure avec les TALEN[®] et de régénérer des plantes ayant intégré un fragment de la matrice de remplacement au niveau du gène ciblé. Cependant cette insertion ne correspond pas à une recombinaison homologue parfaite, mais plutôt à une insertion de morceaux de matrice au niveau de la coupure. Il est possible que les zones d'homologie ne soient pas optimales et forment des structures secondaires gênant la recombinaison homologue, ou que l'évènement de recombinaison homologue soit trop rare pour être trouvé avec les effectifs testés. Cette expérience doit être reproduite en utilisant la puissance de tir 1100PSI et des ADN linéarisés, afin d'augmenter les effectifs traités. Il reste encore à optimiser certains facteurs comme le ratio TALEN[®]:matrice, les quantités de TALEN[®] et de matrice à fixer sur les billes et la concentration en kanamycine du milieu de régénération.

Cette première expérience de biolistique a permis de confirmer la fonctionnalité uniquement du couple de TALEN[®] 222-224. Une autre expérience de biolistique est en cours pour compléter ces résultats, en bombardant les explants avec les TALEN[®] et la matrice sous forme linéarisée (tableau 16).

Une transformation par *A. tumefaciens* a aussi été réalisée pour étudier l'efficacité de coupure des TALEN[®] insérés dans des plasmides binaires. Les plasmides utilisés pour la transformation sont des binaires contenant chaque paire de TALEN[®] séparés par un signal T2A, qui devrait permettre la transcription des deux TALEN[®] en un seul ARNm et donc l'expression des deux protéines de façon équimolaire. Il s'agit dans un premier temps de vérifier si les constructions TALEN[®] sont bien fonctionnelles (coupure au niveau du gène *eIF4E*).

La matrice de remplacement utilisée pour ces expériences porte la modification *pep1* (mutation d'un seul acide aminé), qui confère chez le piment un spectre de résistance étroit. L'obtention de tomates modifiées pour porter cette mutation par ciblage génique, et résistantes aux potyvirus même avec un spectre étroit serait une première preuve de concept dans le cadre du projet GENIUS.

CRISPR/Cas9

Lors de ce stage, une stratégie de ciblage a été conçue sur le gène *eIF4E* avec les CRISPR. Les différentes constructions correspondantes, CRISPR et matrices de remplacement, ont été obtenues en testant les techniques de clonages disponibles. Deux CRISPR ont été obtenus ciblant l'exon 1, deux ciblant l'exon 2, un ciblant le début de l'intron et un dernier ciblant la fin de l'intron.

Les matrices de remplacement adaptées pour les CRISPR portant les modifications *pep1*, *pep2* et *pot1* ont aussi été obtenues, et il reste à réaliser une mutagénèse pour obtenir la matrice *pep3*. Les trois premiers CRISPR ont été obtenus par clonage moléculaire, alors que les trois suivants ont été synthétisés. Etant donné le temps nécessaire pour le clonage quand tout ne fonctionne pas tout de suite, la solution de la synthèse des guides ARN est intéressante car elle comporte moins d'étapes et donc moins d'imprévus. De plus, le coût de la synthèse n'est pas beaucoup plus élevé que le coût d'un clonage si l'on prend en compte les réactifs consommés ainsi que le temps passé.

Il reste encore à insérer chaque couple de CRISPR dans un vecteur binaire pour la transformation, le vecteur de destination étant disponible, ce qui pourra permettre de tester l'efficacité des CRISPR en transformation stable via *A. tumefaciens*. De même pour les deux dernières matrices de remplacement qui n'ont pas encore été insérées dans le vecteur binaire pDe-Cas9 faute de temps.

Des premiers tests d'expression transitoire permettant de vérifier le fonctionnement des CRISPR ont été réalisés, cependant les premières expériences de mise en évidence de coupures par le système CRISPR/Cas9 en expression transitoire n'ont pas donné de résultats positifs.

Cependant, cet événement rare n'est pas toujours évident à détecter, et aucune coupure par des CRISPR n'a pu être mise en évidence au laboratoire par des techniques de biologie moléculaire, même sur des CRISPR différents de ceux mis au point pour *eIF4E*. Bien qu'il soit possible que les CRISPR ne soient pas fonctionnels, le fait que tous ne fonctionnent pas est peu probable. De plus, la preuve de coupure par les CRISPR sur protoplastes de tomate a été prouvée par d'autres techniques (visualisation de l'expression d'un gène rapporteur). Il est possible que l'expression transitoire en protoplastes ne soit pas suffisamment efficace pour mettre en évidence les coupures générées par le système CRISPR/Cas9. Il serait intéressant de chercher à optimiser les paramètres d'électroporation comme la quantité d'ADN électroporée et le ratio CRISPR:Cas9, et de travailler sur les techniques de biologie moléculaire pour les mettre en évidence. Comme il a été montré que l'efficacité des CRISPR variait d'un guide ARN à l'autre selon la séquence ciblée (Bortesi & Fischer, 2014), l'expression transitoire en protoplastes permettrait de tester rapidement plusieurs guides ARN pour ne retenir que les plus efficaces. De plus, des expériences menées au laboratoire récemment ont montré qu'il était possible de régénérer des plantes à partir des protoplastes, ce qui pourrait être une autre façon d'obtenir les plantes modifiées au niveau du gène *eIF4E*.

La durée de ce stage n'a pas été suffisante pour obtenir et analyser les plantules régénérantes pour les expériences de biolistique avec les CRISPR. De plus, de nouvelles transformations par biolistique pourront être lancées avec les nouvelles constructions ainsi que les autres versions de la matrice de remplacement.

Une possibilité serait de remplacer la nucléase Cas9 par une nickase (Cas9 modifiée pour ne couper qu'un seul brin d'ADN; Fauser et al., 2014) pour favoriser la recombinaison homologue au niveau du site de coupure et limiter les risques de coupure ailleurs sur le génome.

Il semblerait que l'efficacité des différentes Cas9 disponibles au laboratoire ou chez les partenaires du projet GENIUS ne soit pas identique, il pourrait donc être intéressant de tester plusieurs Cas9 avec nos ARN guides.

Il serait aussi possible d'exploiter le caractère multiplex du système CRISPR/Cas9 en ciblant à la fois le gène voulu et un autre gène qui permettrait d'obtenir un phénotype visible en insérant les guides ARN correspondants dans un même plasmide. Réussir à faire fonctionner le système CRISPR/Cas9 chez la tomate serait une avancée importante, car ce système est beaucoup plus simple à mettre en œuvre que les TALEN® et moins coûteux.

Quand des plantules modifiées seront obtenues, il faudra encore vérifier que la modification est bien transmise à la descendance et obtenir des plantes homozygotes, avant de pouvoir tester leur résistance aux potyvirus.

V. CONCLUSION

Ce stage a été l'occasion de travailler sur des outils de pointe, mais aussi de comprendre l'importance de disposer de méthodes efficaces de transformation pour mettre en œuvre ces outils chez les plantes.

Plusieurs expériences sont en cours et n'ont pas encore donné de résultats. Les CRISPR ont été définis sur les sites cibles sur *eIF4E*, et les matrices pour l'exon 1 sont prêtes. Il reste maintenant sur le court terme à analyser les plantules que donneront les transformations en cours, et à faire des expériences de transformation avec les dernières matrices obtenues dans le but d'obtenir des plantes modifiées. Il a aussi été possible d'avoir une vue d'ensemble sur la technique de biolistique et son intérêt pour la transformation de la tomate. Aucune plante correspondant parfaitement à l'évènement attendu n'a été obtenue par biolistique avec les TALEN®, mais cette expérience a quand même permis de mettre en évidence que les TALEN® coupent bien au niveau du site cible, ainsi qu'une insertion au moins partielle de la matrice au site attendu.

VI. BIBLIOGRAPHIE

A. Bibliographie

- Bai Y., and Lindhout P. (2007). Domestication and Breeding of Tomatoes: What Have We Gained and What Can We Gain in the Future?. *Annals of Botany*, 100, (5), 1085–94
- Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S., Patron N.J., and Nekrasov V. (2015). Editing Plant Genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, (April), 76–84
- Bibikova M., Carroll D., Segal D.J., Trautman J.K., Smith J., Kim Y.G., and Chandrasegaran S. (2001). Stimulation of Homologous Recombination through Targeted Cleavage by Chimeric Nucleases. *Molecular and Cellular Biology*, 21, (1), 289–97
- Bogdanove A.J., Schornack S., and Lahaye T. (2010). TAL Effectors: Finding Plant Genes for Disease and Defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 13, (4), 394–401
- Bortesi L., and Fischer R. (2014). The CRISPR/Cas9 System for Plant Genome Editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33, (1), 41–52
- Brooks C., Nekrasov V., Lippman Z., and Van Eck J. (2014). Efficient Gene Editing in Tomato in the First Generation Using the CRISPR/Cas9 System. *Plant Physiology*, 166, (3), 1292–1297
- Browning K.S. (2004). Plant Translation Initiation Factors : It Is Not Easy to Be Green. *Biochemical Society Transactions*, 32, (4), 589–591
- Char S.N., Unger-Wallace E., Frame B., Briggs S. a, Main M., Spalding M.H., Vollbrecht E., Wang K., and Yang B. (2015). Heritable Site-Specific Mutagenesis Using TALEN®s in Maize. *Plant Biotechnology Journal*, 13, (7), 1002–10
- Charron C., Nicolai M., Gallois J.-L., Robaglia C., Moury B., Palloix A., and Caranta C. (2008). Natural Variation and Functional Analyses Provide Evidence for Co-Evolution between Plant eIF4E and Potyviral VPg. *Plant Journal*, 54, (1), 56–68
- Clasen B.M., Stoddard T.J., Luo S., Demorest Z.L., Li J., Cedrone F., Tibebu R., et al. (2015). Improving Cold Storage and Processing Traits in Potato through Targeted Gene Knockout. *Plant Biotechnology Journal*, April
- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., et al. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339, (6121), 819–23
- De Lange O., Binder A., and Lahaye T. (2014). From Dead Leaf, to New Life: TAL Effectors as Tools for Synthetic Biology. *Plant Journal*, 78, (5), 753–71
- Fausser F., Roth N., Pacher M., Ilg G., Sánchez-Fernández R., Biesgen C., and Puchta H. (2012). In Planta Gene Targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, (19), 7535–40
- Fausser F., Schiml S., and Puchta H. (2014). Both CRISPR/Cas-Based Nucleases and Nickases Can Be Used Efficiently for Genome Engineering in Arabidopsis Thaliana. *Plant Journal*, 79, (2), 348–359
- Feng Z., Zhang B., Ding W., Liu X., Yang D.-L., Wei P., Cao F., et al. (2013). Efficient Genome Editing in Plants Using a CRISPR/Cas System. *Cell Research*, 23, (10), 1229–32
- Frame B.R., Zhang H., Cocciolone S.M., Sidorenko L. V, Dietrich C.R., Pegg S.U.E.E., Zhen S., Schnable P.S., and Wang K.A.N. (2000). Production of Transgenic Maize from Bombarded Type II Callus : Effect of Gold Particle Size and Callus Morphology on Transformation Efficiency. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 36, (1), 21–29
- Fulton T.M., Chunzoongse J., Tanksley S.D., Breeding P., and Hall E. (1995). Microprep Protocol for Extraction of DNA from Tomato and Other Herbaceous Plants, 13, (3), 207–209

- Gaj T., Gersbach C. a, and Barbas C.F. (2013). ZFN, TALEN[®], and CRISPR/Cas-Based Methods for Genome Engineering. *Trends in Biotechnology*, 31, (7), 397–405
- Hsu P.D., Lander E.S., and Zhang F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 157, (6), 1262–1278
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., and Charpentier E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337, (6096), 816–21
- Kim Y.-G., Cha J.Y., and Chandrasegaran S. (1996). Hybrid Restriction Enzymes : Zinc Finger Fusions to Fok I Cleavage Domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, (3), 1156–1160
- Li J.-F., Norville J.E., Aach J., McCormack M., Zhang D., Bush J., Church G.M., and Sheen J. (2013). Multiplex and Homologous Recombination-Mediated Genome Editing in Arabidopsis and Nicotiana Benthamiana Using Guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, 31, (8), 688–91
- Lor V.S., Starker C.G., Voytas D.F., Weiss D., and Olszewski N.E. (2014). Targeted Mutagenesis of the Tomato PROCERA Gene Using Transcription Activator-like Effector Nucleases. *Plant Physiology*, 166, (3), 1288–91
- Mali P., Esvelt K.M., and Church G.M. (2013). Cas9 as a Versatile Tool for Engineering Biology. *Nature Methods*, 10, (10), 957–63
- Mazier M., Flamain F., Nicolai M., Sarnette V., and Caranta C. (2011). Knock-down of Both eIF4E1 and eIF4E2 Genes Confers Broad-Spectrum Resistance against Potyviruses in Tomato. *PLoS One*, 6, (12), e29595
- Mazón G., Mimitou E.P., and Symington L.S. (2010). SnapShot: Homologous Recombination in DNA Double-Strand Break Repair. *Cell*, 142, (4), 646, 646.e1
- Moscou M.J., and Bogdanove A.J. (2009). A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science*, 326, (5959), 1501
- Piron F., Nicolai M., Minoia S., Piednoir E., Moretti A., Salgues A., Zamir D., Caranta C., and Bendahmane A. (2010). An Induced Mutation in Tomato eIF4E Leads to Immunity to Two Potyviruses. *PLoS One*, 5, (6), e11313
- Puchta H., and Fauser F. (2014). Synthetic Nucleases for Genome Engineering in Plants: Prospects for a Bright Future. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 78, (5), 727–41
- Robaglia C., and Caranta C. (2006). Translation Initiation Factors: A Weak Link in Plant RNA Virus Infection. *Trends in Plant Science*, 11, (1), 40–5
- Ruffel S., Dussault M.-H., Palloix A., Moury B., Bendahmane A., Robaglia C., and Caranta C. (2002). A Natural Recessive Resistance Gene against Potato Virus Y in Pepper Corresponds to the Eukaryotic Initiation Factor 4E (eIF4E). *The Plant Journal*, 32, (6), 1067–1075
- Ruffel S., Gallois J.L., Lesage M.L., and Caranta C. (2005). The Recessive Potyvirus Resistance Gene Pot-1 Is the Tomato Orthologue of the Pepper pvr2-eIF4E Gene. *Molecular Genetics and Genomics*, 274, (4), 346–53
- Schimi S., Fauser F., and Puchta H. (2014). The CRISPR/Cas System Can Be Used as Nuclease for in Planta Gene Targeting and as Paired Nickases for Directed Mutagenesis in Arabidopsis Resulting in Heritable Progeny. *The Plant Journal*, 80, (6), 1139–1150
- Shan Q., Wang Y., Li J., Zhang Y., Chen K., Liang Z., Zhang K., et al. (2013). Targeted Genome Modification of Crop Plants Using a CRISPR-Cas System. *Nature Biotechnology*, 31, (8), 686–8
- Sharma M.K., Solanke A.U., Jani D., Singh Y., and Sharma A.K. (2009). A Simple and Efficient Agrobacterium-Mediated Procedure for Transformation of Tomato. *Journal of Biosciences*, 34, (3), 423–433

- Stoddard B.L. (2011). Homing Endonucleases: From Microbial Genetic Invaders to Reagents for Targeted DNA Modification. *Structure*, 19, (1), 7–15
- Tassy C., Partier A., Beckert M., Feuillet C., and Barret P. (2014). Biolistic Transformation of Wheat: Increased Production of Plants with Simple Insertions and Heritable Transgene Expression. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 119, (1), 171–181
- The Tomato Consortium Genome (2012). The Tomato Genome Sequence Provides Insights into Fleshy Fruit Evolution. *Nature*, 485, (7400), 635–41
- Voytas D.F. (2013). Plant Genome Engineering with Sequence-Specific Nucleases. *Annual Review of Plant Biology*, 64, (January), 327–50
- Wang A., and Krishnaswamy S. (2012). Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Mediated Recessive Resistance to Plant Viruses and Its Utility in Crop Improvement. *Molecular Plant Pathology*, 13, (7), 795–803
- Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., and Qiu J.-L. (2014). Simultaneous Editing of Three Homoeoalleles in Hexaploid Bread Wheat Confers Heritable Resistance to Powdery Mildew. *Nature Biotechnology*, 32, (9), 947–51
- Waterworth W.M., Drury G.E., Bray C.M., and West C.E. (2011). Repairing Breaks in the Plant Genome: The Importance of Keeping It Together. *The New Phytologist*, 192, (4), 805–22
- Wei C., Liu J., Yu Z., Zhang B., Gao G., and Jiao R. (2013). TALEN® or Cas9 - Rapid, Efficient and Specific Choices for Genome Modifications. *Journal of Genetics and Genomics*, 40, (6), 281–9
- Wittmann S., Chatel H., and Fortin M.G. (1997). Interaction of the Viral Protein Genome Linked of Turnip Mosaic Potyvirus with the Translational Eukaryotic Initiation Factor (Iso) 4E of Arabidopsis Thaliana Using the Yeast Two-Hybrid System, 92, (234), 84–92

CONFIDENTIAL

CONFIDENTIEL